

UNTERSUCHUNGEN ZUR CHEMISCHEN SYNTHESE EINES
SEQUENZSPEZIFISCHEN DESOXYRIBOOLIGONUCLEOTIDES
UNTER VERWENDUNG NEUER SYNTHESEMETHODEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

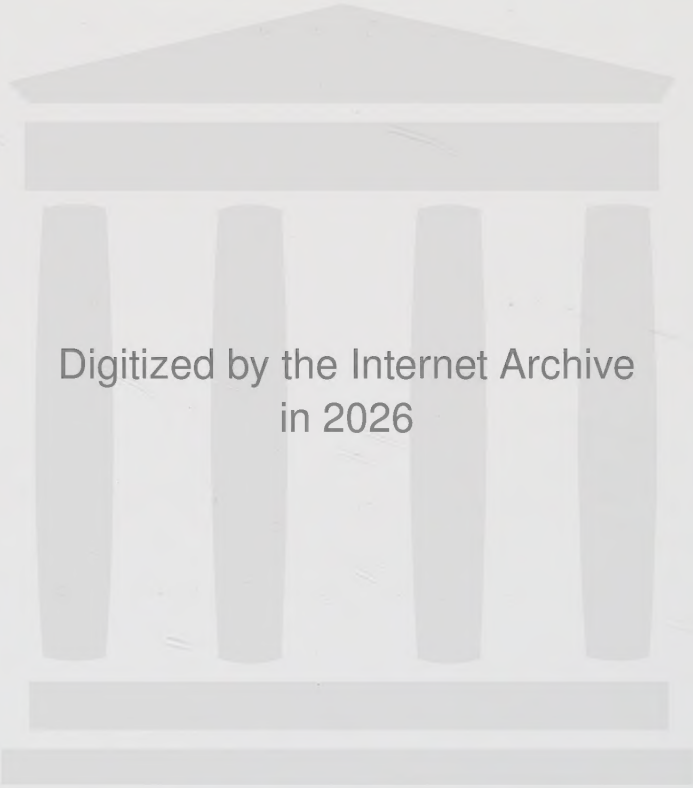
Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Br.

vorgelegt von

Helmut Schütz

aus Baden-Baden

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNTERSUCHUNGEN ZUR CHEMISCHEN SYNTHESE EINES
SEQUENZSPEZIFISCHEN DESOXYRIBOOLIGONUCLEOTIDES
UNTER VERWENDUNG NEUER SYNTHESEMETHODEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Br.

vorgelegt von

Helmut Schütz .

aus Baden-Baden

1979

Dekan: Prof. Dr. H. Rimpler
Leiter der Arbeit: Prof. Dr. H. Seliger
Referent: Prof. Dr. Th. Ackermann
Korreferent: Prof. Dr. H. Seliger

Tag der Bekanntgabe des Prüfungsergebnisses:

5. Juli 1979

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 1974 bis März 1977 im Institut für Makromolekulare Chemie der Universität Freiburg und von April 1977 bis September 1978 in der Sektion Polymere an der Universität Ulm unter der Leitung von Prof.Dr.H.Seliger durchgeführt.

Herrn Prof.Dr.H.Seliger möchte ich danken für die Überlassung des Themas und seine Bereitschaft, durch wertvolle Diskussionen und Anregungen diese Arbeit zu ermöglichen.

Meinen Arbeitskollegen Herrn Dipl.Chem. T.C.Bach und Herrn Dr. M.Holupirek danke ich für kritische und aufmunternde Gespräche sowie für die in Ulm erwiesene Gastfreundschaft.

Der Universität Freiburg bin ich für die Gewährung eines Graduiertenstipendiums zu Dank verpflichtet.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Allgemeines zur Nucleinsäurechemie	1
1. Zusammensetzung und Aufbau biologischer DNS	1
2. Nomenklatur und Abkürzungen in der Nucleinsäurechemie	2
I. Einleitung	4
II. Zielsetzung der Arbeit	8
III. Methoden der chemischen Desoxyriboooligonucleotid-Synthese	10
1. Allgemeines Syntheseprinzip	10
2. Schutzgruppen in der Oligonucleotid-Synthese	11
3. Diester- und Triesterverfahren	12
4. Die schrittweise Synthese von Oligonucleotiden	13
5. Synthese von Oligonucleotiden durch das Cooligokondensationsverfahren	15
IV. Darstellung der Ergebnisse	19
1. Problemstellung bei der Verbesserung des Cooligokondensationsverfahrens	19
1.1. Optimierung der Reaktionsbedingungen in der Cokondensation	19
1.2. Bedingungen für die Affinitätschromatografie	19
1.3. Auftrennung der Cooligomeren an DEAE-Cellulose	20
2. Reaktionsbedingungen der Cooligokondensation	20
2.1. Einfluß des Kondensationsmittels	20
2.2. Einfluß des Mischungsverhältnisses der Monomeren auf die Produktzusammensetzung	21
3. Abtrennung der Cooligomeren durch Affinitätschromatografie an hydrophoben Säulenmaterialien	25
3.1. Tritylcellulose als hydrophobes Affinitäts-sorbens	26
3.2. Kapazität der Tritylcellulose	27
3.2.1. Affinität des pdG^{ibu} zu Tritylcellulose	27
3.2.2. Affinität des Kondensationsmittels zu Tritylcellulose	29
3.2.3. Affinität der Cooligomeren $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n$ zu Tritylcellulose	30
3.2.4. Affinitätschromatografische Trennung von Cooligokondensationsprodukten an Tritylcellulose	34

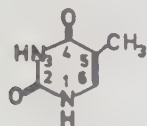
3.3. Trennversuche an Gelen mit hydrophoben Seitengruppen	37
4. Auftrennung der Cooligomeren nach Kettenlänge	42
4.1. DEAE-Cellulose Trennungen unter Zusatz von DMF	43
4.2. DEAE-Cellulose Trennungen mit Äthanol-Zusatz	44
4.3. Charakterisierung der geschützten und ungeschützten Cooligomeren durch UV-spektroskopische und chromatografische Daten	48
4.4. Enzymatische Analyse der Cooligomeren d-T(pG) _n	50
5. 5'-Phosphorylierung von Oligonucleotiden	51
5.1. Schutz der 3'-OH-Gruppe	52
5.2. Abspaltung der 5'-MMTr-Schutzgruppe	53
5.3. Methoden zur 5'-Phosphorylierung von geschützten Oligonucleotiden	53
5.4. 5'-Phosphorylierung von 5'-HO-TpdG ^{ibu} pdG ^{ibu} _{Ac} mit β-Cyanoäthylphosphat	54
5.5. 5'-Phosphorylierung mit POCl ₃	58
6. Versuche zur Synthese eines heptameren Oligonucleotids durch Blockkondensation	60
6.1. Reaktionsmechanismen bei der Kondensation von Diester-(Oligo)nucleotiden und deren Konsequenzen für die Synthese	60
6.2. Versuche zur Blockierung der Phosphodiesterbindungen von Oligonucleotiden	62
6.3. Versuche zur Blockkondensation	63
6.3.1. Blockkondensationen mit dem Kondensationsmittel Mesitylensulfonylchlorid (MS)	64
6.3.2. Blockkondensationsversuche mit dem Kondensationsmittel Mesitylensulfonyltetrazolid	65
6.4. Test der Baublöcke auf Zugänglichkeit der 3'-OH- bzw. der 5'-Phosphatgruppe	67
6.4.1. Test der 3'-OH-Blöcke auf Zugänglichkeit der 3'-OH-Gruppe	67
6.4.2. Test des 5'-Phosphatblocks HO-TpdG ^{ibu} pdG ^{ibu} _{Ac}	68
6.5. ³ H-Austausch an pdG und T(pdG) _n ^{ibu}	69
6.6. Blockkondensation von MMTrT(pdG ^{ibu}) ₃ -OH mit pTpdG ^{ibu} pdG ^{ibu} _{Ac} und anschließender radioaktiver Markierung durch ³ H-Austausch	71
7. Synthese des Heptameren d-TGGGTGG nach dem Triesterverfahren	72
7.1. Syntheseprinzip der Triestermethode	72
7.2. Synthese der monomeren Triester	73

7.2.1. Synthese der 5'- (u. basen-) geschützten Nucleoside	76
7.2.2. Synthese des monofunktionellen Phosphorylierungsmittels	76
7.2.3. Synthese der vollständig geschützten Triester-Monomere	77
7.2.4. Abspaltung der 5'-MMTr-Schutzgruppe zur Darstellung der Hydroxylkomponente	77
7.2.5. Abspaltung der β -Cyanoäthyl-Gruppe zur Darstellung der 3'-Diester-Komponente	78
7.3. Reaktionsbedingungen zum Aufbau eines Oligonucleotid-Triesters	78
7.3.1. Kondensationsmittel	79
7.3.2. Kondensationsbedingungen und Isolierung der Produkte	80
7.3.3. Kieselgel-short-column-Chromatografie zur Auftrennung von Triester-Bausteinen	81
7.4. Synthese des Heptanucleotids d-TGGGTGG in der Triesterform	83
7.5. Analyse des synthetisierten Oligonucleotides	87
7.5.1. Synthese des Octameren d-TGGGTGGT	87
7.5.2. Abspaltung der Schutzgruppen	87
7.6. Abschließende Bemerkung zur Triestersynthese	91
V. Diskussion der Ergebnisse	92
VI. Zusammenfassung	99
VII. Experimenteller Teil	100
VIII. Literaturverzeichnis	124
IX. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	130

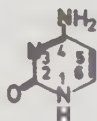
Allgemeines zur Nucleinsäurechemie

1. Zusammensetzung und Aufbau biologischer DNS

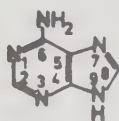
Natürlich vorkommende Desoxyribonucleinsäure (DNS) enthält als Monomerbausteine vier Desoxyribonucleotide, die sich durch die in ihnen enthaltenen Nucleobasen unterscheiden:



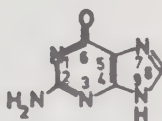
Thymin



Cytosin

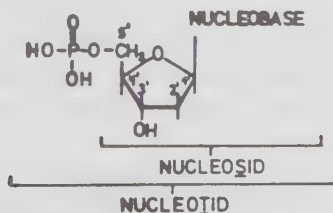


Adenin



Guanin

Diese Nucleobasen sind mit dem Zuckerrest, einer 2'-Desoxyribose, am C 1'-Atom über eine β -glykosidische C-N-Bindung zu den Nucleosiden verknüpft, im Falle der Pyrimidinbasen erfolgt die Verknüpfung am N 1-Atom und im Falle der Purin-Basen am N 9-Atom. Die Phosphomonoester der Nucleoside werden als Nucleotide bezeichnet. Je nachdem, welche Hydroxylgruppe des Zuckers verestert ist, unterscheidet man zwischen Nucleosid-5'-monophosphat und Nucleosid-3'-monophosphat:



In biologischer DNS sind diese Desoxyribonucleotide durch Phosphodiester-Brücken zwischen der 3'-Hydroxylgruppe des einen Monomeren und der 5'-Phosphatgruppe des benachbarten Monomeren miteinander verknüpft, wie in Abb. 1 S.2 dargestellt wird.

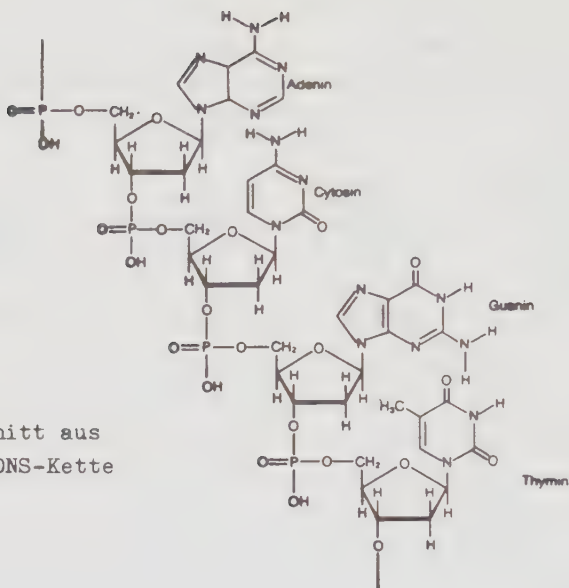


Abb. 1

Ausschnitt aus
einer DNS-Kette

2. Nomenklatur und Abkürzungen in der Nucleinsäurechemie

Für Nucleinsäuren und Nucleinsäurebausteine werden von der IUPAC-IUB Commission¹ die folgenden Abkürzungen, die auch in dieser Arbeit verwendet werden, empfohlen:

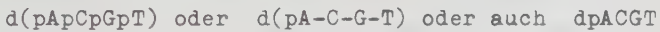
Desoxynucleoside: dA = Desoxyadenosin
dC = Desoxycytidin
dG = Desoxyguanosin
dT = Desoxythymidin = Thymidin
dM/dN = nicht spezifiziertes Nucleosid

Desoxynucleotide werden durch ein vorgestelltes (-5'-monophosphat) bzw. nachgestelltes (-3'-monophosphat) kleines p gekennzeichnet, also z.B.:

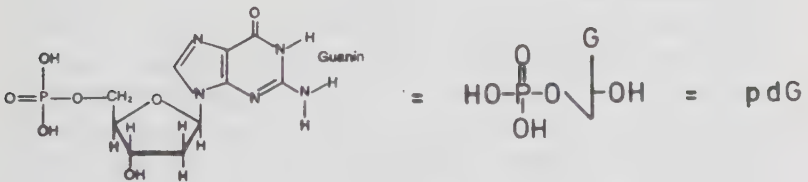
p dA = Desoxyadenosin-5'-monophosphat
oder 5'-Desoxyguanylsäure
dGp = Desoxyguanosin-3'-monophosphat
oder 3'-Desoxyguanylsäure

Bei Oligonucleotiden werden die Phosphodiesterbindungen zwischen den Nucleotiden (Internucleotidbindungen) durch ein eingefügtes kleines p oder einen Bindestrich symbolisiert. Endständige Phosphatgruppen werden wie bei den Nucleotiden angegeben.

Für ein Oligonucleotid der Sequenz 5'-Phosphodesoxyadenilyl-(5'-3')-desoxycytidilyl-(5'-3')-desoxyguanylyl-(5'-3')-thymidin gelten somit folgende Schreibweisen:



In dieser Arbeit wird meist auch folgende schematische Darstellung der Desoxy(oligo)nucleotide verwendet:



I. Einleitung

Die Nucleinsäuren spielen eine zentrale Rolle in dem noch jungen, aber stark beachteten Forschungsgebiet der Molekularen Biologie, welches die elementaren Regeln des biochemischen Ablaufs der Lebensvorgänge zu klären sucht.

Ein erster Hinweis auf die biologische Bedeutung der Nucleinsäuren wurde bereits, wie der Name sagt, durch deren Isolierung aus Zellkernen nach ihrer Entdeckung durch F. MIESCHER² 1869 gegeben. Aber erst 80 Jahre später konnten AVERY u. Mitarb.³ (1944) in ihrem klassischen Transformationsexperiment zeigen, daß in den Nucleinsäuren die Erbinformation einer Zelle enthalten sein muß, womit auch die von BEADLE u. TATUM⁴ (1941) aufgestellte "Ein Gen-ein Enzym"-Hypothese bekräftigt wurde. Mit der Röntgenstrukturanalyse der DNS und dem daraus abgeleiteten Modell der Doppelhelix von WATSON u. CRICK⁵ (1953) konnten alle bis dahin bekannten Daten über Chemie und Funktion der DNS in einem plausiblen Modell zusammengefaßt und beschrieben werden. Das sich aus diesem Modell ergebende Prinzip der Basenpaarung ermöglichte nicht nur das Verständnis der Replikation der DNS und somit der Basis der Weitergabe der genetischen Information, sondern gab auch eine Erklärung für die Umsetzung dieser Information in Polypeptide, also für die Regulation der Proteinbiosynthese. Die erste durch eine Nucleinsäure gesteuerte Polypeptidsynthese im zellfreien System gelang dann NIERENBERG u. MATTHAEI⁶ (1961), die mit Hilfe der Polyuridylsäure das Polypeptid Polyphenylalanin synthetisierten.

Um den Zusammenhang zwischen Polypeptidsequenz und Nucleinsäuresequenz zu klären, wurde von KHORANA u. Mitarb. die erste grössere biochemische Untersuchung mit synthetischen Oligonucleotiden durchgeführt: Dieser Arbeitsgruppe gelang die Synthese aller 64 möglichen Ribotrinnucleotide und dadurch die Entschlüsselung des genetischen Codes⁷.

Während in der Folgezeit die chemische Synthese von Oligonucleotiden nur langsam verbessert werden konnte, wurden auf dem Gebiet der Sequenzierung von RNS (Ribonucleinsäure) bald hervorragende Ergebnisse erzielt (HOLLEY⁸; FIERS et al.⁹). Auch die Bestimmung der Primärstruktur von biologischer DNS, die lange Zeit wegen des Fehlens von Sequenz- oder Basen-spezifischen Endonucleasen aussichtslos erschien, läßt sich seit 3-4 Jahren durch die Arbeiten von SANGER¹⁰ sowie von MAXAM und GILBERT¹¹ in effizienter Weise durchführen.

Durch die wachsende Kenntnis der Sequenzen biologischer Nucleinsäuren wird auch ein immer weiterer Bereich zur Aufklärung molekularbiologischer Mechanismen eröffnet. Damit bieten sich zugleich neue Anwendungsbereiche für die Synthese von Nucleinsäuren - was in letzter Zeit auch zu einem starken Anwachsen des Interesses an synthetischen Oligo- und Polynucleotiden geführt hat. Einige dieser Anwendungsmöglichkeiten sollen nachstehend aufgeführt werden:

a) Synthetische Oligonucleotide als Starter für DNS- und RNS-Polymerasen

Doppelsträngige Desoxyribooligonucleotide wurden als Starter für das Enzym DNS-Polymerase I zum Aufbau längerer, doppelsträngiger DNS benötigt. Dieses Verfahren wurde zur Entschlüsselung des genetischen Codes angewandt¹².

Zur Sequenzierung von DNS nach SANGER^{10,13} wurden einzelsträngige Oligonucleotide spezifischer Sequenz eingesetzt, die als Starter die Replication der DNS-Matrize von bestimmten Punkten ab ermöglicht.

Weiterhin lassen sich synthetische Oligonucleotide als Starter für die Transcription einer RNS Sequenz mit Hilfe des Enzyms Reverse Transcriptase einsetzen¹⁴, wie in Abb. 2 dargestellt ist. Über eine weitere Anwendungsmöglichkeit dieser Reaktion wird in Kap. II Seite 9 berichtet.

I. Einleitung

Die Nucleinsäuren spielen eine zentrale Rolle in dem noch jungen, aber stark beachteten Forschungsgebiet der Molekularen Biologie, welches die elementaren Regeln des biochemischen Ablaufs der Lebensvorgänge zu klären sucht.

Ein erster Hinweis auf die biologische Bedeutung der Nucleinsäuren wurde bereits, wie der Name sagt, durch deren Isolierung aus Zellkernen nach ihrer Entdeckung durch F. MIESCHER² 1869 gegeben. Aber erst 80 Jahre später konnten AVERY u. Mitarb.³ (1944) in ihrem klassischen Transformationsexperiment zeigen, daß in den Nucleinsäuren die Erbinformation einer Zelle enthalten sein muß, womit auch die von BEADLE u. TATUM⁴ (1941) aufgestellte "Ein Gen-ein Enzym"-Hypothese bekräftigt wurde. Mit der Röntgenstrukturanalyse der DNS und dem daraus abgeleiteten Modell der Doppelhelix von WATSON u. CRICK⁵ (1953) konnten alle bis dahin bekannten Daten über Chemie und Funktion der DNS in einem plausiblen Modell zusammengefaßt und beschrieben werden. Das sich aus diesem Modell ergebende Prinzip der Basenpaarung ermöglichte nicht nur das Verständnis der Replikation der DNS und somit der Basis der Weitergabe der genetischen Information, sondern gab auch eine Erklärung für die Umsetzung dieser Information in Polypeptide, also für die Regulation der Proteinbiosynthese. Die erste durch eine Nucleinsäure gesteuerte Polypeptidsynthese im zellfreien System gelang dann NIERENBERG u. MATTHAEI⁶ (1961), die mit Hilfe der Polyuridylsäure das Polypeptid Polyphenylalanin synthetisierten.

Um den Zusammenhang zwischen Polypeptidsequenz und Nucleinsäuresequenz zu klären, wurde von KHORANA u. Mitarb. die erste grössere biochemische Untersuchung mit synthetischen Oligonucleotiden durchgeführt: Dieser Arbeitsgruppe gelang die Synthese aller 64 möglichen Ribotrinucleotide und dadurch die Entschlüsselung des genetischen Codes⁷.

Während in der Folgezeit die chemische Synthese von Oligonucleotiden nur langsam verbessert werden konnte, wurden auf dem Gebiet der Sequenzierung von RNS (Ribonucleinsäure) bald hervorragende Ergebnisse erzielt (HOLLEY⁸; FIERS et al.⁹). Auch die Bestimmung der Primärstruktur von biologischer DNS, die lange Zeit wegen des Fehlens von Sequenz- oder Basen-spezifischen Endonucleasen aussichtslos erschien, läßt sich seit 3-4 Jahren durch die Arbeiten von SANGER¹⁰ sowie von MAXAM und GILBERT¹¹ in effizienter Weise durchführen.

Durch die wachsende Kenntnis der Sequenzen biologischer Nucleinsäuren wird auch ein immer weiterer Bereich zur Aufklärung molekularbiologischer Mechanismen eröffnet. Damit bieten sich zugleich neue Anwendungsbereiche für die Synthese von Nucleinsäuren - was in letzter Zeit auch zu einem starken Anwachsen des Interesses an synthetischen Oligo- und Polynucleotiden geführt hat. Einige dieser Anwendungsmöglichkeiten sollen nachstehend aufgeführt werden:

a) Synthetische Oligonucleotide als Starter für DNS- und RNS-Polymerasen

Doppelsträngige Desoxyribooligonucleotide wurden als Starter für das Enzym DNS-Polymerase I zum Aufbau längekettiger, doppelsträngiger DNS benötigt. Dieses Verfahren wurde zur Entschlüsselung des genetischen Codes angewandt¹².

Zur Sequenzierung von DNS nach SANGER^{10,13} wurden einzelsträngige Oligonucleotide spezifischer Sequenz eingesetzt, die als Starter die Replication der DNS-Matrize von bestimmten Punkten ab ermöglicht.

Weiterhin lassen sich synthetische Oligonucleotide als Starter für die Transcription einer RNS Sequenz mit Hilfe des Enzyms Reverse Transcriptase einsetzen¹⁴, wie in Abb. 2 dargestellt ist. Über eine weitere Anwendungsmöglichkeit dieser Reaktion wird in Kap. II Seite 9 berichtet.

II. Zielsetzung der Arbeit

Im Hinblick auf die Tatsache, daß die Darstellung von DNS-Fragmenten schwierig und sehr arbeitsintensiv ist, haben verschiedene Gruppen unterschiedliche Methoden zur Vereinfachung der chemischen Synthese von Desoxyriboonucleotiden untersucht. Im Arbeitskreis von H.SELIGER (H.SELIGER et al.^{28,29,30}) wurde eine wesentliche Synthesevereinfachung durch Anwendung des Verfahrens der sequenzspezifischen Cokondensation von Nucleinsäurebausteinen mit Affinitätsschutzgruppen erreicht (Siehe hierzu auch S.15 ff.).

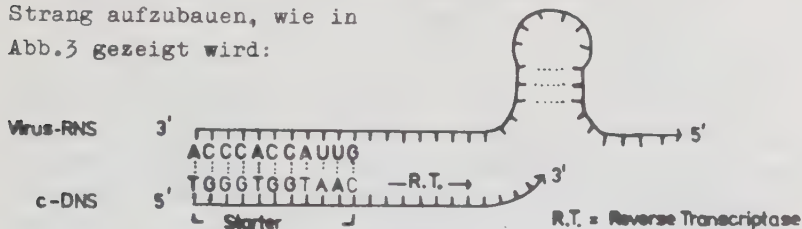
Im Rahmen meiner Diplomarbeit³¹ waren innerhalb dieses Gesamtprojektes erste Untersuchungen über die Cokondensation des Monomerenpaares Thymidin/Desoxyguanylsäure durchgeführt worden, in denen der präparative Weg zur Cokondensation dieser beiden Partner in kleinen Mengen erkundet worden war. In meiner Doktorarbeit war es nun das Ziel, diese bisher in kleinem Maßstab ausgeführten Arbeitsschritte auf die Darstellung grösserer Mengen zu übertragen. In diesem Zusammenhang sollten auch quantitative Daten über die verwendeten Affinitätstrennmethoden und deren Limitierung gewonnen werden. Schließlich sollte ein erstes Beispiel für die praktische Anwendung der Methode im Aufbau biologisch interessanter Polynucleotide realisiert werden. Hierzu war vorgesehen, die beiden aus der Cokondensation gewonnenen Fragmente d-TGGG und d-TGG nach der Phosphorylierung des Trimeren zu einer Sequenz d-TGGGTGG zu kombinieren, die ihrerseits als Teilsequenz zum Aufbau des Polynucleotids d-TGGGTGGTAAC benötigt wurde.

Molekularbiologische Anwendung der Sequenz d-TGGGTGGTAAC:

Die oben genannte DNS-Sequenz stellt nicht nur ein gutes Beispiel für eine Synthese nach dem Cooligokondensationsverfahren dar, sondern sie ist auch eine Sequenz von beträchtlicher biologischer Bedeutung. Nachstehend sollen einige molekularbiologische Untersuchungen angedeutet

werden, die sich mit Hilfe dieser Sequenz durchführen lassen, welche aber nicht im Rahmen meiner Arbeit erfolgen sollten.

Die genannte Sequenz ist komplementär zum gemeinsamen 3'-Ende mehrerer RNS-Viren und ist somit als c-DNS(copy-DNS)-Fragment für das Enzym reverse Transcriptase (RNS-abhängige DNS-Polymerase) als Starter geeignet, um so einen der Virus-RNS (als Matrize) komplementären DNS Strang aufzubauen, wie in Abb.3 gezeigt wird:



Von einem dieser Viren, dem Bakteriophagen MS 2, liegt inzwischen die vollständige Primärstruktur vor; was die Sekundärstruktur angeht, so wurde von FIERIS u. Mitarb.⁹ die Bildung einer Reihe von doppelhelicalen Bereichen postuliert. Da die Wirkung der Reversen Transcriptase durch Rückfaltung der RNS-Matrize behindert oder sogar blockiert wird, könnte man die Verlängerung der synthetischen c-DNS benutzen, um die Richtigkeit der vorgeschlagenen Sekundärstruktur in verschiedenen Denaturierungszuständen gewissermaßen abzutasten. Hierdurch könnten Versuche von FROLOVA u. Mit.³² ergänzt werden, die im Falle des Phagen MS 2 die vollständige Transcription eines 59 Nucleotide umfassenden RNS-Fragmentes erreichten. Bei noch nicht sequenzierten RNS-Viren mit gleichem 3'-Terminus könnte dieser synthetische Starter zum Aufbau einer komplementären DNS eingesetzt werden, deren Sequenzierung nach der Methode von MAXAM u. GILBERT¹¹ einfacher als die Sequenzierung der Matrizen-RNS sein dürfte.

Eine dritte Einsatzmöglichkeit einer solchen chemisch aufgebauten c-DNS, die sich für die Zukunft eventuell

abzeichnet, ist die zellbiologische Anwendung im Sinne eines "Hybridons" (ZAMECNIK & STEPHENSON³³). Mit Hilfe solcher Hybridonen kann unter Umständen das Wachstum pathogener Viren gehemmt, d.h. eine pharmakologische Wirkung auf der Basis synthetischer Oligonucleotide erzielt werden.

III. Methoden der chemischen Desoxyribooligonucleotidsynthese

Da, wie in Kap. IV gezeigt wird, die Synthese der vorgesehenen Sequenz d-TGGGTGG eine Erweiterung des Methodenspektrums über das Cooligokondensationsverfahren hinaus erforderlich machte, erscheint es notwendig, der Darstellung der Ergebnisse eine kurze Zusammenfassung der derzeit vorhandenen Methoden zur chemischen Synthese von Desoxyribooligonucleotiden voranzustellen.

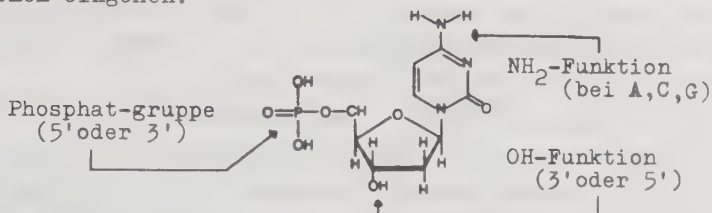
1. Allgemeines Syntheseprinzip

Ziel einer Oligonucleotidsynthese ist im allgemeinen die Darstellung einer spezifischen Sequenz, in der die Monomeren über 5'-3'-Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft sind, so wie dies in DNS aus biologischem Material der Fall ist. Dazu werden kürzerkettige Oligonucleotide mit einer Kettenlänge von ca. 8-12 gewöhnlich durch chemische Verfahren synthetisiert, durch deren Verknüpfung mit Hilfe spezieller enzymatischer Methoden längerkettige und doppelsträngige DNS-Fragmente gewonnen werden können (Übersichtsartikel: H.SELIGER u. H.KÖSSEL³⁴).

Da sich meine Arbeit ausschließlich mit der chemischen Synthese von Desoxyribooligonucleotiden beschäftigt, werden im folgenden nur chemische Methoden beschrieben. Zur Vereinfachung wird dabei statt Desoxyribooligonucleotid meist nur Oligonucleotid geschrieben.

2. Schutzgruppen in der Oligonucleotidsynthese

Nucleotide besitzen mehrere funktionelle Gruppen, die bei der Verknüpfung zu Oligonucleotiden chemische Reaktionen eingehen:



Um sicherzustellen, daß nur die gewünschte Bildung der 5'-3' Internucleotidbindung erfolgt, müssen diejenigen funktionellen Gruppen, die hierzu nicht benötigt werden, durch geeignete Schutzgruppen blockiert werden. Diese sollten die Bildung des Phosphodiesters nicht behindern und auch ohne Spaltung der Internucleotidbindung wieder zu entfernen sein. Eine weitere Forderung ist, daß möglichst nur eine der vorhandenen Funktionen, also Hydroxyl- oder Phosphat- oder Basenaminogruppen, möglichst selektiv und quantitativ geschützt und wieder von Schutzgruppen befreit werden soll. Diejenigen Schutzgruppen, die sich in der Oligonucleotidsynthese bewährt haben und üblicherweise eingesetzt werden, sind in Tabelle 1 zusammengestellt:

Tab. 1: Schutzgruppen zur Oligonucleotidsynthese

funktionelle Gruppe	Art der Schutzgruppe	besonders gebräuchlich für	Abspaltungsbedingungen	Abkürzung
-NH ₂	acetyl- iso-butyryl- methyl-butyryl- benzoyl- anisoyl-	G " " A, (G) C	alkal. " " " "	ac ibu mbu bz an
-OH	Acetyl- Monomethoxytrityl- Dimethoxytrityl-	alle T alle	alkal. sauer "	Ac MMTr DMTr
-PO ₃ H ₂	β-cyanoäthyl-	alle	alkal.	CE

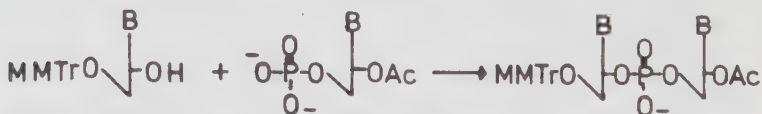
Geschützte Nucleoside oder Nucleotide werden dadurch symbolisiert, daß die Abkürzung der Aminoschutzgruppe in kleinen Buchstaben rechts oben neben das Nucleosidsymbol und die Abkürzung der 5'-OH- bzw. 3'-OH-Schutzgruppe mit beginnendem Großbuchstaben vor bzw. rechts unter das Nucleosidsymbol gesetzt wird;

z.B. $\text{DMTrdG}_{\text{Ac}}^{\text{ibu}}$, MMTrdT , $\text{pdC}_{\text{Ac}}^{\text{an}}$ usw.

Die in Tab.1 zusammengestellten Schutzgruppen sind nur eine kleine Auswahl der von verschiedenen Arbeitsgruppen vorgeschlagenen. Für spezielle Anwendungsbereiche und Synthesestrategien sind noch wesentlich mehr und unterschiedliche Schutzgruppen entwickelt und eingesetzt worden³⁴. In meiner Arbeit fanden nur Schutzgruppen Verwendung, die in Tab.1 enthalten sind.

3. Diester- und Triesterverfahren

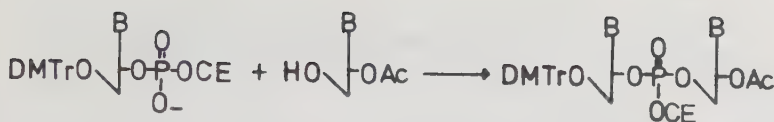
Eine Internucleotidbindung kann geknüpft werden, indem man die Hydroxylgruppe eines entsprechend geschützten Nucleosids oder Nucleotids mit der Phosphomonoestergruppe eines geschützten Nucleotids verestert. Dabei stellt die Internucleotidbindung eine einfach negativ geladene Phosphodiestergruppe dar. Dieses Vorgehen ist mit das Grundprinzip der Methode ("Diestermethode"), wie sie von H.G.KHORANA u. Mitarb.⁷ ausgearbeitet wurde (Schema 1).



Schema 1

B = (geschützte) Nucleobase

Ein grundsätzlich anderes Verfahren beruht auf der Veresterung der Hydroxylkomponente mit einem Nucleosid-Phosphodiester (am Phosphatrest geschütztes Nucleotid) unter Ausbildung einer Internucleotidbindung, die eine neutrale Phosphotriestergruppe darstellt (Triester-
methode), wie in Schema 2 gezeigt wird.



Schema 2

B = (geschützte) Nucleobase

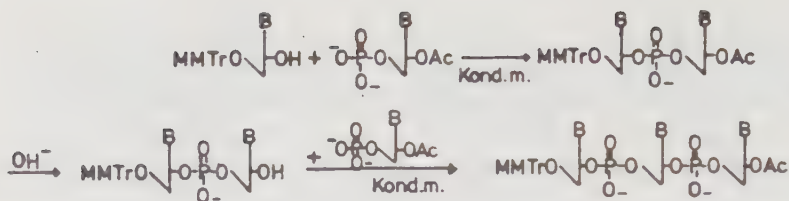
Diese Methode wird zwar schon länger angewendet^{35/36}, aber erst in den letzten 3-4 Jahren gelangen der Arbeitsgruppe um NARANG^{37/38} durch Heranziehen neuer Trennmethode damit sehr gute Syntheserfolge. Mittlerweile hat sich dieses sogenannte "Triesterverfahren" sogar als das in vieler Hinsicht bessere Syntheseprinzip für Oligonucleotide durchgesetzt.

Bei der hier vorgelegten Arbeit wurde zunächst noch größtenteils von der Diestermethode ausgegangen, so daß es sinnvoll erscheint, im folgenden einige Varianten dieser Methode vorzustellen, die sich mit einigen Einschränkungen aber auch auf Synthesen nach der Triestermethode übertragen lassen. Im zweiten Teil der Arbeit wird dann näher auf die Triestermethode eingegangen und deren Anwendungsweise diskutiert.

Der Entscheidung, ob die Oligonucleotidsynthese nach der Diester- oder Triestermethode erfolgen soll, überlagert sich die Frage, ob die Synthese nach schrittweisen- oder nichtschrittweisen Verfahren erfolgen soll. Diese beiden Varianten werden im nächsten Abschnitt diskutiert.

4. Die schrittweise Synthese von Oligonucleotiden

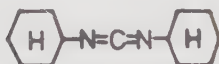
Bei dieser am häufigsten eingesetzten Methode wird ein Oligonucleotid so aufgebaut, daß man an die wachsende Kette jeweils eine Monomereinheit d.h. ein entsprechend geschütztes Nucleotid anfügt. Nach selektiver Abspaltung der terminalen Schutzgruppe kann wieder um eine Einheit verlängert werden. Siehe dazu Schema 3 :



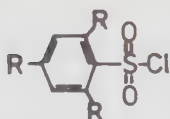
Schema 3

B = (geschützte) Nucleobase

Um das Veresterungsgleichgewicht in Richtung der Bildung der Internucleotidbindung zu verschieben, muß die Phosphatkomponente "aktiviert" werden. Hierzu wird ein Kondensationsmittel zugesetzt, meist eines der durch folgende Formeln beschriebenen Reagentien :



Dicyclohexylcarbodiimid = DCC



R=CH₃ : Mesitylensulfonylchlorid
= MS

R=CH(CH₃)₂: 2,4,6 Triisopropylbenzol-
sulfonylchlorid = TPS

Einige Vorstellungen über die Wirkungsweise der Kondensationsmittel werden bei der Besprechung der Blockkondensation und der Triestermethode diskutiert (Seite 60 ff. und S.79 ff.).

Trotz Anwendung solcher Kondensationsmittel erzielt man keine quantitative Ausbeute an Internucleotidbindung, so daß nach jeder Kettenverlängerung das Produkt von den Ausgangsverbindungen und den meist unvermeidlichen Nebenprodukten abgetrennt werden muß. Da alle Oligonucleotide negativ geladen sind, die Gesamtladung aber von der Kettenlänge abhängt, finden zur Auftrennung Anionenaustauscher Verwendung, üblicherweise DEAE-Cellulose (Diethylaminoethyl-cellulose). Eine methodische Verbesserung der Trennung wird durch die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatografie (HPLC) an speziellen Anionenaustauschern³⁹ oder hydrophoben Trennmaterien (reversed phase)⁴⁰ erzielt. Alternative Trennmöglichkeiten bieten Extraktions-⁴¹

und affinitätschromatografische Verfahren. Zusammenfassend läßt sich zu der in Schema 3 beschriebenen schrittweisen Synthese sagen, daß sie zwar den Vorteil relativ hoher Ausbeuten hat, dafür aber ein Maximum an einzelnen Teilschritten (Schutz-, Aktivierungs- und Trennoperationen) erfordert.

Zur Vereinfachung der Darstellung von Oligonucleotiden wird von einigen Arbeitsgruppen versucht, die Synthese an polymeren Trägern durchzuführen^{42/43}. Bei diesem Verfahren wird das Monomere, welches den Kettenanfang bildet, an einem unlöslichen Trägermaterial fixiert. Der Aufbau des Oligonucleotides erfolgt schrittweise, wobei die Reinigungs- und Trennschritte sich zu einfachen Filtrations- und Waschvorgängen reduzieren. Die Oligonucleotidsynthese an Trägern kann jedoch bisher mit der Peptidsynthese nach MERRIFIELD⁴⁴ nicht konkurrieren. Da die Kettenverlängerung nicht quantitativ, sondern nur mit mässigen Ausbeuten erfolgt und eine Reihe von Nebenprodukten am Träger haftet, ergeben sich Schwierigkeiten bei der Reinigung des gewünschten Produktes, die die anderweitigen Vorteile auf dem Gebiet der Trennung wieder weitgehend zunichte machen und die Synthese länger-kettiger Oligonucleotide an Trägern bisher unvorteilhaft erscheinen lassen. Es ist jedoch möglich, daß die Anwendung der Affinitätschromatografie (H.SELIGER et al.⁴⁵) und das Triesterverfahren in der Trägersynthese einige Verbesserungen bewirken.

5. Synthese von Oligonucleotiden durch das Cooligokondensationsverfahren

Die mit Hilfe eines Computerprogrammes durchgeführte Analyse einiger aus der Literatur bekannter biologischer Nucleinsäuresequenzen⁴⁶ ergab, daß man sie vollständig aus Segmenten des allgemeinen Typs $A(B)_n$ oder $(A)_nB$ zusammensetzen kann (wobei A und B = Nucleotid, $n = 3-4$). Um die Synthese von Oligonucleotidfragmenten dieses Typs

zu vereinfachen, wurde von unserer Arbeitsgruppe das Verfahren der sequenzspezifischen Cooligokondensation von Nucleinsäurebausteinen mit Affinitätsschutzgruppen ausgearbeitet²⁸⁻³⁰. Bei dieser Synthesemethode wird nicht wie bei der schrittweisen Synthese ein an allen funktionellen Gruppen (außer dem Phosphatrest) geschütztes Nucleotid an die Hydroxylkomponente ankondensiert, sondern die Phosphatkomponente bleibt an der Hydroxylgruppe ungeschützt und ist somit bifunktionell. Die 3'-Hydroxylkomponente ist dagegen durch das Blockieren der 5'-Funktion mit einer Schutzgruppe eine monofunktionelle Verbindung. Setzt man z.B. folgende Ausgangsprodukte ein:

Nucleosid A mit freier 3'-OH Gruppe ,
Nucleotid pB mit freier 5'-Phosphat- u. 3'-OH-Gruppe,
dann ergibt sich eine sequenzspezifische Cokondensation nach Schema 4 :



Schema 4

Aus den Ausgangsprodukten entstehen also durch Cokondensation Oligonucleotide des Typs $(\text{pB})_n$ (Homooligomere) und Oligonucleotide des Typs $A(\text{pB})_n$ (Cooligomere), die letzteren sind das gewünschte Produkt. Obwohl Homopolykondensationen von Nucleotiden von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht worden sind, findet sich in der Literatur vor 1975 nur ein Beispiel für eine Copolykondensation, bei dem auch die Trennung von Homo- und Cooligomeren gelang⁴⁷. Im allgemeinen ist mit Hilfe der üblichen Trennmethode (DEAE-Cellulose) eine vollständige Trennung der entstehenden Isoplethengemische ($(\text{pB})_n$ und $A(\text{pB})_{n-1}$) nicht möglich. Um Cooligomere von den Homooligomeren abtrennen zu können, wird in dem in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Verfahren die monofunktionelle Komponente mit einer "Affinitätsschutzgruppe" blockiert. Diese Schutzgruppe dient einerseits zum Blockieren eines Kettenendes, besitzt aber andererseits auch eine

Affinität zu einem entsprechenden immobilisierten Effektor, also einem Affinitätssorbens. Führt man nun die Affinitätsschutzgruppe X in Schema 4 ein, dann ergeben sich die im folgenden Schema 5 angegebenen Reaktions- und Trennschritte für den Aufbau von Oligonucleotiden des Typs $A(pB)_n$:

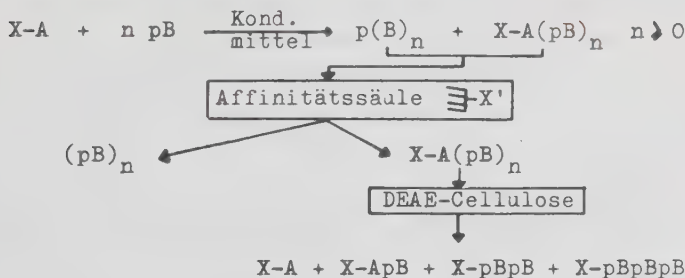
Schema 5 : Sequenzspezifische Cooligokondensation

X = Affinitätsschutzgruppe mit Affinität zum X-spezifischen Effektor X'

Ξ -X' = Affinitätssorbens

X-A = Nucleosid A mit 5'-X-Schutzgruppe und freier 3'-OH-Funktion

pB = Nucleotid B mit freier 5'-Phosphat und 3'-OH-Gruppe



Für die in diesem Zusammenhang notwendigen Affinitätstrennungen können unterschiedliche Wechselwirkungen ausgenutzt werden. Einen Überblick über die in unserer Arbeitsgruppe benutzten Affinitätstrennungen gibt der folgende Abschnitt.

Affinitätschromatografie von Oligonucleotiden: Die Trennung durch Affinitätschromatografie beruht auf einer spezifischen Wechselwirkung zwischen der zu trennenden Substanz in der mobilen Phase und dem an einem unlöslichen Trägermaterial fixierten Liganden (Effektor). Zur affinitätschromatografischen Trennung von ungeschützten Polynucleotiden oder Polynucleotid-Fragmenten werden meist folgende Wechselwirkungen ausgenutzt:

- a) Die Basenpaarung zwischen Oligo- oder Polynucleotiden in der mobilen Phase und einer am Träger fixierten Komplementär-Sequenz ⁴⁸.
- b) Die Bildung eines Komplexes zwischen einem Oligo- oder Polynucleotid mit endständigem Ribonucleosidrest und einem Sorbens mit Boronat-Effektorgruppen ⁴⁹.
- c) Hg-S Wechselwirkungen : Es wird die Affinität eines Oligonucleotids mit mercurierten Basen zu Polymeren mit Sulfhydryl-Resten ⁵⁰ bzw. die Affinität eines Oligonucleotids mit HS-Gruppen zu einem Organoquecksilber-Harz als Sorbens ⁵¹ zur Trennung ausgenutzt.
- d) Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Polynucleotiden mit lipophilen Substituenten und Säulenmaterialien mit hydrophoben Effektorgruppen (z.B. Tyrosin beladene t-RNS^{Tyr} - benzoyleierte DEAE-Cellulose ⁵²) lassen sich im weiteren Sinn zu den Affinitätstrennungen zählen.

Alle diese genannten Wechselwirkungen können auch zur Abtrennung geschützter Oligonucleotide herangezogen werden - zum Beispiel:

- a) Bildung eines Komplexes zwischen den Boronat-Resten des Säulenmaterials und der cis-Diol Gruppe eines Desoxy-ribooligonucleotides mit einem endständigen Ribouridylrest ²⁸.
- b) Bildung einer Hg-S Bindung zwischen einem Oligonucleotid, das mit einer -einen Thiol-Rest enthaltenden - Schutzgruppe (reduzierte Lipoylgruppe ⁵³) blockiert ist und einem Säulenmaterial mit Organoquecksilbergruppen.
- c) Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Oligonucleotiden mit lipophilen Schutzgruppen (z.B. MMTr-) und hydrophobisierten Säulenmaterialien wie Trityl- oder Naphthyl-carbamoyl-Cellulose ⁵⁴.

Von den genannten affinen Partnerpaaren wurde im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich das System hydrophobe Schutzgruppe - Tritylcellulose (bzw. anderweitiges hydrophobes Säulenmaterial) eingesetzt und genauer untersucht.

IV. Darstellung der Ergebnisse

1. Problemstellung bei der Verbesserung des Cooligokondensationsverfahrens

Die Synthese von Oligonucleotiden spezifischer Sequenz über das Cooligokondensationsverfahren erfolgt in drei Schritten :

1. Kondensation der Ausgangsprodukte
2. Trennung über eine Affinitätschromatografie
3. Auftrennung der affinen Bestandteile nach Kettenlänge

Auf jeder dieser Reaktionsstufen waren noch Probleme zu lösen, um damit das Verfahren zu optimieren und die Synthese von Oligonucleotiden effektiver zu gestalten. Im folgenden werden diese Probleme kurz angeschnitten.

1.1. Optimierung der Reaktionsbedingungen in der Cokondensation

Bei Cokondensationen mit Desoxyguanylsäure lassen sich höhere Ausbeuten an Cooligomeren nur mit einem großen Überschuß an Nucleotid-Komponente erzielen. Eine Rückgewinnung der nicht umgesetzten Nucleotid-Komponente ist aber nur mit einigem Aufwand durchzuführen, so daß nach einem Kompromiß zwischen großem Überschuß mit hohen Ausbeuten und kleinerem Überschuß mit geringeren Ausbeuten gesucht werden muß.

1.2. Bedingungen für die Affinitätschromatografie

Dieser Schritt entscheidet über die Brauchbarkeit der Methode; denn nur wenn die vollständige Trennung zwischen affinen und nicht-affinen Bestandteilen gewährt ist, können saubere und einheitliche Produkte erhalten werden. Zur optimalen Ausnutzung der Trennleistung der Tritylcellulose müssen daher die wichtigsten Eigenschaften dieses Säulenmaterials, wie Spezifität und Kapazität, sowie deren Abhängigkeit von der Polarität des Elutionsmittels und der Art der affinen Oligonucleotide bestimmt werden.

1.3. Auftrennung der Cooligomeren an DEAE-Cellulose

Die Auftrennung von Oligonucleotiden an DEAE-Cellulose ist ein bewährtes und reproduzierbares Verfahren; beim Cooligokondensationsverfahren besteht aber die Schwierigkeit, daß eine homologe Reihe von Oligonucleotiden, die sich jeweils nur durch eine negative Ladung voneinander unterscheiden, aufgetrennt werden muß. Bei Synthesen im schrittweisen Verfahren müssen dagegen nur zwei Glieder einer homologen Reihe getrennt werden. Ebenso bereitet die Übertragung einer Trennung vom kleinen Maßstab auf einen grösseren erhebliche Schwierigkeiten, wie aus meiner ³¹ und aus der Diplomarbeit von H.GÖRTZ ⁵⁵ ersichtlich wird.

Die Untersuchung der Punkte 1.1. - 1.3. soll es erlauben, grundsätzlich die Frage zu prüfen, ob sich das Cooligokondensationsverfahren zur Synthese längererkettiger sequenzspezifischer Oligonucleotide bewährt. Hierzu gilt es weiter, die Bedingungen zur Phosphorylierung der Cooligomeren sowie zu deren Blockkondensation zu untersuchen. Wie in Kap.II dargelegt wurde, sollen diese Untersuchungen am Beispiel der Synthese eines Heptanucleotids durchgeführt werden.

2. Reaktionsbedingungen der Cooligokondensation

2.1. Einfluß des Kondensationsmittels

Innerhalb der Diplomarbeit ³¹ wurden bei Cooligokondensationen die drei bis vor einiger Zeit am meisten eingesetzten Kondensationsmittel DCC, MS und TPS getestet.

Dabei zeigte sich, daß mit DCC ein geringerer Umsatz als mit den Arylsulfonylchloriden erzielt wird.

Das Mesitylensulfonylchlorid ergab zwar gute Umsätze, aber der Anteil an längererkettigen Cooligomeren war geringer als bei Verwendung des Triisopropylsulfonylchlorids, so daß bei allen in dieser Arbeit beschriebenen Cooligokondensationen nur das letztere Kondensationsmittel eingesetzt wurde. Um Nebenreaktionen, wie Sulfonierungen und

die Bildung stark gefärbter Nebenprodukte, weitgehend zu verhindern, wurde bei allen Cooligokondensationen das Kondensationsmittel TPS in maximal dreifachem Überschuß (bezogen auf die Nucleotid-Komponente) eingesetzt. Testreaktionen zeigten, daß auch mit wesentlich grösseren Überschuß an Kondensationsmittel nur geringe Umsatzsteigerungen erzielt werden (siehe Tab.2 S.22)

2.2. Einfluß des Mischungsverhältnisses der Monomeren auf die Produktzusammensetzung

Zur Klärung des Zusammenhangs zwischen Verhältnis der Ausgangsprodukte im Reaktionsansatz und der Gesamtausbeute an Cooligomeren sowie deren Kettenlängeverteilung wurden Cooligokondensationen mit verschiedenen Ausgangsmischungen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab.2 aufgeführt.

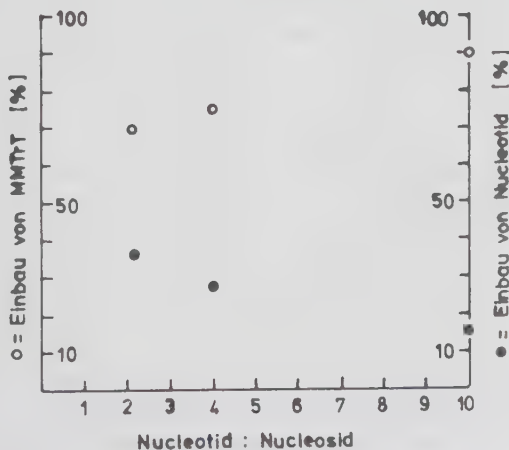
Diese Daten zeigen für die Abhängigkeit der Ausbeuten an Cooligomeren (gemessen als Einbau von MMTrT) vom Überschuß an Nucleotid-Komponente den in Abb.4 dargestellten Zusammenhang.

Abb. 4 :

Einbau von
MMTrT bzw.
Nucleotid in
Cooligomere in
Abhängigkeit
vom Nucleotid-
Überschuß

(Im Nucleotid:
3'-OH:Abbrecher
= 3:1)

Nucleotid=
pdG^{Ibu}
(Ibu)



Für das hier untersuchte Cooligokondensationssystem erwies sich ein 3-4facher Überschuß an Nucleotid als günstig, wobei ein 70-80%iger Umsatz an MMTrT erzielt wurde.

Tab.2 : Cooligomere MMTrT(pdGibu)_n :
Ausbeuten und Kettenlängen-Verteilung in Abhängigkeit
von der Zusammensetzung des Reaktionsansatzes

Ansatz ^{a)} Nr.	relatives Verhältnis der Ausgangsprodukte MMTrT:pdGibu : pdGibu : TPS	Einbau in Cooligomere (%) MMTrT Nucleotid	Zusammensetzung ^{b)} der Cooligomeren (Mol%) n=1 n=2 n=3 n=4 n=5	mittlere ^{c)} Ketten- länge
1	1 7,5 2,5 15	90	54 28 13 5	2,7
2 ^{d)}	1 10 1 20	60		2,4 ^{e)}
3	1 5 2 14	55	79 15 5 1	2,3
4	1 1,3 0,75 3,6		84 14 2	2,1
5	1 1,7 0,55 7,5	70		2,2 ^{e)}
6	1 3 1 8	75	52 32 16 f)	2,6
7	1 4 1 12	80	46 27 16 8 3	2,9
8	1 3,3 1 7,3	67	46 33 16 5 g)	2,8

- a) absolute Mengen im experimentellen Teil
b) nur Fraktionen mit n ≤ 5 berücksichtigt
c) mittlere Kettenlänge s. Fußnote auf Seite 23
d) nur Einbau von MMTrT bestimmt (durch Extraktion des unumgesetzten MMTrT)
e) mittlere Kettenlänge aus E_{472nm}:E_{260nm} berechnet
f) nur bis Fraktion n=3 bestimmt, Fraktionen mit n > 3 unter 5%
g) nur bis Fraktion n=4 bestimmt, Fraktionen mit n > 4 unter 2%

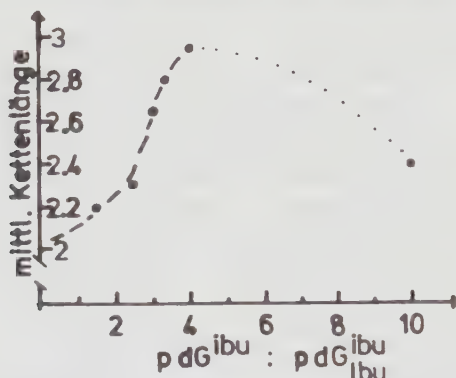
Eine weitere Umsatzsteigerung um 10% erfordert dagegen eine Verdopplung des Nucleotidanteils auf etwa einen 10fachen Überschuß. Da das nicht umgesetzte Nucleotid nur schwer wieder zurückgewonnen werden kann, lohnt sich der Einsatz eines solch hohen Überschusses nicht.

Bei allen in Tab.2 beschriebenen Cooligokondensationen wurden nur die Cooligomeren nach Kettenlänge getrennt und charakterisiert. Die Produktverteilung der Homooligomeren wurde nicht untersucht; dies hatte zwei Gründe: Zum einen wurden diese Oligonucleotide nicht benötigt, zum anderen sollten sie in ähnlicher Zusammensetzung wie nach einer Homo-Polykondensation vorliegen. Denn bei einem 3-4fachen Überschuß an Nucleotid, wie er hier zweckmässigerweise verwendet wurde, wird nur ca. 30% dieser Komponente in Cooligomere eingebaut (vergl. Abb.4, Seite 21), sodaß man annehmen kann, daß die Polykondensation der Nucleotide pdG^{ibu} zu Homooligomeren weitgehend unabhängig von der Bildung der Cooligomeren erfolgt. Solche Homo-Polykondensationen sind jedoch durch Arbeiten von KHORANA et al.⁵⁶ ausführlich untersucht und deren Produktverteilung ermittelt worden. Aus diesen und anderen Untersuchungen⁴⁷ wurde deutlich, daß der Anteil an cyclischen Homooligomeren durch die Zugabe eines Kettenabbruchers, in Form eines am 3'-OH blockierten Nucleotids (also nur noch monofunktionell), reduziert werden kann. Bei einer Cooligokondensation müßte der Anteil an cyclischen Homooligomeren durch die Zugabe einer solchen Abbrecherkomponente ebenfalls verringert werden. Dadurch würden mehr lineare Homooligomere entstehen, die im Gegensatz zu den cyclischen Oligomeren mit der Nucleosidkomponente zu Cooligomeren weiterreagieren könnten. Um den Einfluß eines Abbrechers auf die mittlere Kettenlänge* der Cooligomeren zu untersuchen, wurden Cooligokondensationen mit unterschiedlichem Verhältnis von bi-

* Die mittlere Kettenlänge der Cooligomeren $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n$ unterscheidet sich vom Zahlennittel des Polykondensationsgrads durch Nichtberücksichtigung des Polykondensationsgrades 1 (also MMTrT unberücksichtigt) d.h. mittlere Kettenlänge = $\bar{n}+1$.

funktionellem (pdG^{ibu}) zu monofunktionellem Nucleotid ($\text{pdG}_{\text{Ibu}}^{\text{ibu}}$) durchgeführt und die Produktzusammensetzung bestimmt (vergl. Tab.2). Die grafische Darstellung der Ergebnisse ist in Abb.5 gezeigt.

Abb.5 : Cooligomere $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n$: Abhängigkeit der mittleren Kettenlänge vom Verhältnis $\text{pdG}^{\text{ibu}}/\text{pdG}_{\text{Ibu}}^{\text{ibu}}$



Diese Darstellung veranschaulicht, daß mit grösser werdendem Verhältnis bifunktionelle / monofunktionelle Komponente die mittlere Kettenlänge ansteigt, bei einem sehr grossen Überschuß an bifunktioneller Komponente aber wieder auf einen Wert von ca. 2,4 abfällt. Dieser Zusammenhang ermöglicht eine gewisse Beeinflussung der Produktverteilung durch die Nucleotidzusammensetzung, um so gezielt kürzerkettigere oder längerkettigere Cooligomere aufzubauen. Es wird aber auch deutlich, daß eine Steigerung der mittleren Kettenlänge auf Werte über 3-3,5 mit dem hier verwendeten Kondensationsmittel TPS nicht möglich ist, längerkettigere Cooligomere also nur in geringem Prozentsatz (ca 10% für Kettenlänge >4) entstehen. Der insgesamt niedrige Absolutwert der Kettenlänge läßt sich dadurch erklären, daß bei jeder Kondensationsreaktion die Ausbeute an Phosphodiesterbildung mit steigender Kettenlänge abnimmt.

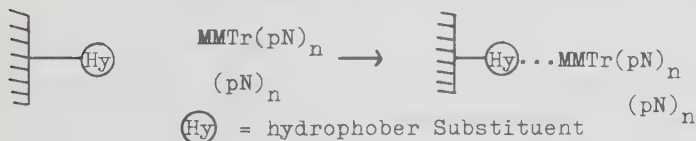
Aus den hier erläuterten Cooligokondensationsversuchen

folgt, daß es auch unter optimalen Reaktionsbedingungen (3-4 facher Nucleotidüberschuß gegenüber MMTrT und bifunktionelles : monofunktionelles Nucleotid = 1 : 4) nur sinnvoll ist, Cooligomere bis zur Kettenlänge 4 , eventuell noch bis 5, in einem Cooligokondensationsverfahren herzustellen.

3. Abtrennung der Cooligomeren durch Affinitätschromatografie an hydrophoben Säulenmaterialien

Eine Retardierung MMTr-geschützter Oligonucleotide sollte in wässrigem Milieu an jedem Säulenmaterial erfolgen, das über hydrophobe Gruppen verfügt, während nicht-MMTr-geschützte Oligonucleotide im Idealfall die Säule ungehindert durchlaufen sollten, wie dies in Abb.6 veranschaulicht wird.

Abb.6 : Abtrennung MMTr-geschützter Oligonucleotide an hydrophoben Säulenmaterialien



Diese Trennung erfolgt nicht spezifisch nach MMTr-Gruppen, sondern nach allen hydrophoben Gruppen, so daß man eigentlich von hydrophober Chromatografie und nicht von Affinitätschromatografie sprechen müßte. Vereinfachend wird hier im weiteren aber stets eine Trennung dieser Art als Affinitätschromatografie (MMTr-spezifisch) bezeichnet.

Mono- und Oligonucleotide, deren Nucleobasen mit hydrophoben Gruppen geschützt sind (z.B. pdG^{ibu} , pdA^{bz} , pdC^{an}), gehen mit den entsprechenden Säulenmaterialien auch dann, wenn sie nicht mit einer MMTr-Gruppe geschützt sind,

nicht zu vernachlässigende hydrophobe Wechselwirkungen ein, so daß die Trennung nach Affinität nicht mehr MMTr-spezifisch wird. Um diese Unspezifität durch Wechselwirkungen mit geschützten Nucleobasen auszuschliessen, müssen für jedes Cooligokondensationssystem und für jedes affinitätschromatografische Säulenmaterial geeignete Elutionsbedingungen ermittelt werden. Da sich die Tritylcellulose bereits qualitativ als gutes Affinitätssorbens erwiesen hatte, lag es nahe, an diesem System die affinitätschromatografischen Parameter zu untersuchen.

3.1. Tritylcellulose als hydrophobes Affinitätssorbens

Die Abtrennung Trityl- bzw. Monomethoxytritylgrupper enthaltender Oligonucleotide von nicht-tritylierten Komponenten mit Hilfe einer Tritylcellulosesäule wurde erstmals von KHORANA et al.⁵⁴ beschrieben. Bei diesen Trennungen wurde eine Tritylcellulose (s. Abb. 7) mit einem Gehalt von 0,23 Tritylgruppen pro Glucose-Einheit eingesetzt, die durch Reaktion einer Suspension von Cellulose in Pyridin mit Tritylchlorid hergestellt worden war.

Für unsere Arbeiten stand eine Tritylcellulose mit einem wesentlich höheren Substitutionsgrad von ca. 1-1,1 zur Verfügung, die nach einem von E. SIEFERT⁵⁷ entwickelten Verfahren dargestellt wurde.

Der höhere Umsatz mit Tritylchlorid wird durch Reaktion in der Schmelze anstelle einer Suspension erreicht. Dazu wird die Cellulose in Form von Zellwolle in einer Schmelze von N-Äthylpyridiniumchlorid und DMSO mit Tritylchlorid zur Reaktion gebracht. Durch Fällung der Schmelze in Methanol erhält man ein Material, das sich gut für die Säulenchromatografie eignet.

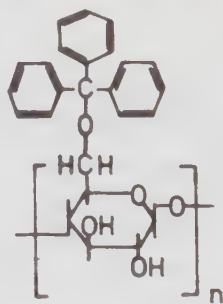


Abb. 7: Tritylcellulose

3.2. Kapazität der Tritylcellulose

Ein wichtiges Kriterium für ein affinitätschromatografisches Trennmateriel ist seine Trennschärfe und Kapazität für affines Material. Weiterhin soll der am Säulenmaterial retardierte, affine Anteil eines Substanzgemisches wieder möglichst quantitativ vom Affinitäts-sorbens abzulösen sein.

Bei den hier ausgeführten Cooligokondensationen von MMTrT mit pdG^{ibu} und $\text{pdG}_{\text{Ibu}}^{\text{ibu}}$ müssen also überschüssiges, nicht reagiertes Mononucleotid, Homooligomere und Pyrophosphate sowie das Kondensationsmittel vollständig aus der Säule gewaschen sein, bevor die affinen Anteile (restliches MMTrT und Cooligomere) eluiert werden. Um diese Bedingungen zu gewährleisten, mußte das Verhalten der nicht-affinen Produkte an Tritylcellulose ermittelt werden. Diese Modellversuche sind in Abschnitt 3.2.1. und 3.2.2. beschrieben, wobei als Modell für alle pdG^{ibu} -Komponenten (Homooligomere u. Pyrophosphate) das monofunktionelle Nucleotid $\text{pdG}_{\text{Ibu}}^{\text{ibu}}$ herangezogen wurde.

3.2.1. Affinität des $\text{pdG}_{\text{Ibu}}^{\text{ibu}}$ zu Tritylcellulose

KHORANA et al.⁵⁴ berichten, daß sowohl an der NH_2 -Funktion geschützte als auch ungeschützte Mononucleotide ebenso wie geschützte Dinucleotide von pdG^{ibu} und pT an der von Ihnen verwendeten Tritylcellulose schon bei einer Äthanolkonzentration des Elutionsmittels von 10% keinerlei Adsorption zeigten. Bei der von uns benutzten, wesentlich hydrophoberen Tritylcellulose war aber eine stärkere Adsorption auch von nicht-tritylierten Komponenten zu erwarten, so daß die Bedingungen von KHORANA für unser Trennsystem nicht anzuwenden waren. In den zitierten Arbeiten sind auch keine genauen Angaben über die Kapazität ihrer Tritylcellulose enthalten. Somit war es wichtig, Daten zur Kapazität dieses Trennmateriels durch eigene Untersuchungen zu gewinnen.

Zunächst wurde dazu die Affinität des Monomeren $\text{pdG}_{\text{Ibu}}^{\text{ibu}}$

zu Tritylcellulose in Abhängigkeit vom Alkoholgehalt des Elutionspuffers untersucht. Diese Daten lassen sich auch auf das Verhalten der Homooligomeren und der Pyrophosphate übertragen, wenn man annimmt, daß deren Affinität zu Tritylcellulose nicht grösser ist als die des Mononucleotids. Diese Annahme wurde durch das Verhalten der Cooligomeren bestätigt, bei denen die Affinität zur Tritylcellulose mit steigender Kettenlänge abnimmt (vergl. S.32).

Zur Ermittlung der Kapazität der Tritylcellulose für $\text{pdG}_{\text{Ibu}}^{\text{ibu}}$ wurde eine Tritylcellulose-Säule mit diesem Mononucleotid gesättigt, d.h. es wurde solange eine Lösung des Nucleotids durch die Säule geleitet, bis im Eluat gegenüber der auf den Kopf der Säule gegebenen Lösung kein Konzentrationsunterschied mehr festzustellen war. Solche Sättigungsbedingungen können auch auftreten, wenn eine Reaktionslösung (z.B. aus einer Cooligokondensation) durch die Säule geleitet wird, die das nicht-affine Mononucleotid in grossem Überschuß enthält. Nach der vollständigen Auswäsche des nicht gebundenen Nucleotids wurde der retardierte Anteil mit 80% Äthanol/0,2M TBK - Puffer eluiert und UV-spektroskopisch quantitativ erfaßt (Daten in Tab.3 und Abb.8).

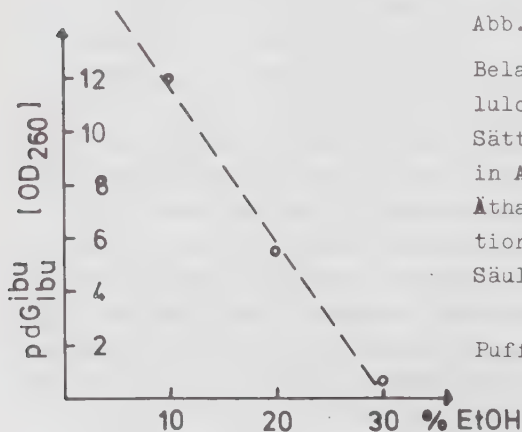


Abb.8 :

Beladung der Tritylcellulose mit $\text{pdG}_{\text{Ibu}}^{\text{ibu}}$ (unter Sättigungsbedingungen) in Abhängigkeit vom Äthanolgehalt des Elutionsmittels.

Säule: 1,3 x 7 cm

2,4 g = 6 mmol Tritylgruppen

Puffer: % EtOH/0,2 M TBK

Wie in Tab.3 zu sehen ist, wird bei einem Alkoholgehalt von 10 % eine keinesfalls zu vernachlässigende Menge an $\text{pdG}_{\text{Ibu}}^{\text{ibu}}$ vom Affinitätssorbens zurückgehalten. Erst bei 30% Äthanolgehalt wird praktisch kein Mononucleotid mehr retardiert.

Tab. 3: Kapazität von Tritylcellulose für $\text{pdG}_{\text{Ibu}}^{\text{ibu}}$
(Säulendimensionen s. S.28 , Abb.8)

% EtOH im Elutions- puffer	retardiertes $\text{pdG}_{\text{Ibu}}^{\text{ibu}}$		
	$\frac{\text{O.D. (260 nm)}}{\text{mmol Trityl-gruppen}}$	$\frac{\text{mmol} \cdot 10^{-4}}{\text{mmol Trityl-gruppen}}$	$\frac{\text{mmol} \cdot 10^{-4}}{\text{g Trityl-cellul.}}$
10	2	1,2	3
20	0,92	0,55	1,36
30	0,17	0,1	0,25

Die Abnahme der Affinität des Nucleotids zur Tritylcellulose mit steigendem Äthanolgehalt wurde auch deutlich in der Verringerung des Volumens an Eluans, das bis zur vollständigen Elution des nicht gebundenen Nucleotids benötigt wurde : 10% - 270 ml, 20% - 180 ml, 30% - 130 ml .

3.2.2. Affinität des Kondensationsmittels zu Tritylcellulose

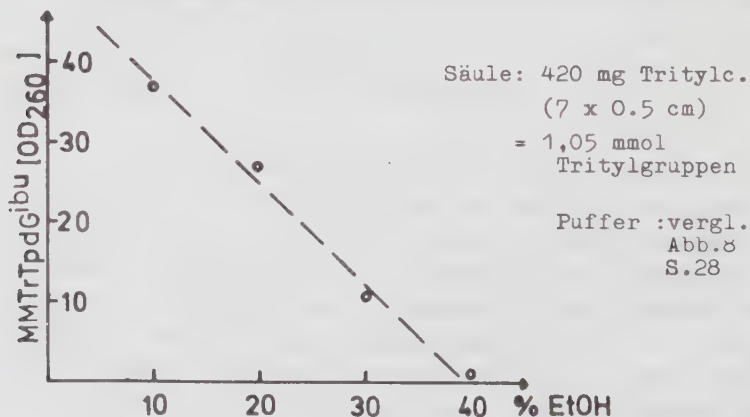
Um zu prüfen, ob auch ein anderer Bestandteil des nicht-affinen Anteils einer Kondensation, nämlich das Kondensationsmittel bzw. dessen Hydrolysat von der Tritylcellulose retardiert wird, wurde obiger Test auch mit dem Pyridiniumsalz der Triisopropylbenzolsulfonsäure durchgeführt. Zur quantitativen Auswertung wurde das Extinktionsmaximum bei 279 nm herangezogen. Dabei konnte gezeigt werden, daß bei einem Äthanolgehalt von 30% das Salz der Triisopropylbenzolsulfonsäure keine Adsorption an der Tritylcellulose erfährt.

3.2.3. Affinität der Cooligomeren $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n$ zu Tritylcellulose

Nachdem das Verhalten des nicht-affinen Anteils eines Cooligokondensationsgemisches an Tritylcellulose geklärt worden war, sollte die Kapazität der Tritylcellulose für die Cooligomeren in Abhängigkeit von der Kettenlänge und vom Äthanolgehalt des Elutionspuffers bestimmt werden. Während dieser Versuchsreihe blieb die Kapazität konstant, da bei Wiederholung der Versuche, unter gleichen Bedingungen, stets identische Meßwerte (innerhalb der Fehlergrenzen) registriert wurden.

Die Beziehung zwischen Kapazität der Affinitätssäule und Alkoholgehalt des Elutionsmittels wurde am Beispiel des dimeren Cooligomeren $\text{MMTrTpdG}^{\text{ibu}}$ untersucht, dabei wurde mit der Sättigungsmethode wie beim nicht-affinen Nucleotid gearbeitet. Die grafische Auftragung der Ergebnisse in Abb.9 zeigt, daß mit steigendem Alkoholgehalt die Beladung der Tritylcellulose mit Dimeren linear abnimmt.

Abb.9 : Beladung der Tritylcellulose mit $\text{MMTrTpdG}^{\text{ibu}}$ in Abhängigkeit von der Äthanol-Konzentration



Die Kapazität in mmol Dimeren pro mmol Tritylgruppe an der Tritylcellulose und pro g Tritylcellulose wird in Tab. 4 angegeben.

Tab.4 : Beladung von Tritylcellulose mit MMTrTpdG^{ibu}

EtOH (%)	MMTrTpdG ^{ibu}		$\frac{E_{260}}{E_{472}}$	MMTrTpdG ^{ibu} x)	
	O.D. (260nm)	Q.D. (472nm)		$\frac{\text{mmol} \cdot 10^{-3}}{\text{mmol Trityl-gruppen}}$	$\frac{\text{mmol} \cdot 10^{-3}}{\text{g Trityl-cellul.}}$
10	37	76	0,49	1,38	3,29
20	27	55	0,49	1,0	2,38
30	14	27	0,52	0,49	1,17
40	1	2	0,5	0,04	0,09

x) als molarer Extinktionskoeffizient wurde eingesetzt:
bei 260 nm = 25500 (KHORANA), bei 472 nm = 55000 (eigener Meßwert)

Die hier gewonnenen Daten machen deutlich, daß bei Äthanolkonzentrationen über 30% zuwenig Dimeres retardiert wird, um eine effektive Affinitätstrennung durchführen zu können.

Weiterhin war es für das Cooligokondensationsverfahren erforderlich zu wissen, ob und wie sich die Affinität der Cooligomeren zur Tritylcellulose mit steigender Kettenlänge ändert. Dazu wurden Cooligomere mit definierter Kettenlänge, die durch Auftrennung eines Cooligomerengemisches auf DEAE-Cellulose gewonnen wurden, dem Affinitätstest unterworfen. Die quantitative Auswertung erfolgte wieder durch Messung der Extinktion bei 260 nm und bei 472 nm (in 70%iger HClO₄ Abspaltung der MMTr-Schutzgruppe als MMTr⁺-Kation, das bei 472 nm ein Extinktionsmaximum hat). Vor und nach dem Affinitätstest wurde zur Kontrolle der Einheitlichkeit der Cooligomeren das Verhältnis $E_{260}:E_{472}$ bestimmt und mit den berechneten Extinktionsverhältnissen verglichen. Hierzu wurden die theoretischen Extinktionskoeffizienten (bei 260 nm) additiv aus den Koeffizienten^{*)} der Monomereinheiten ohne Berücksichtigung einer Hypochromie ermittelt. Die gute Übereinstimmung zwischen berechneten und gemessenen E_{260}/E_{472} zeigt, daß die eingesetzten Oligonucleotide in hoher Reinheit vorlagen.

Diese Meßreihe wurden bei 10% und 30% Äthanolgehalt durchgeführt, wobei für das Nucleosid MMTrT beim niedrigen

*) für MMTrT $\epsilon_{260} = 8900$, für pdG^{ibu} $\epsilon_{260} = 16600$
MMTr⁺ $\epsilon_{472} = 55000$

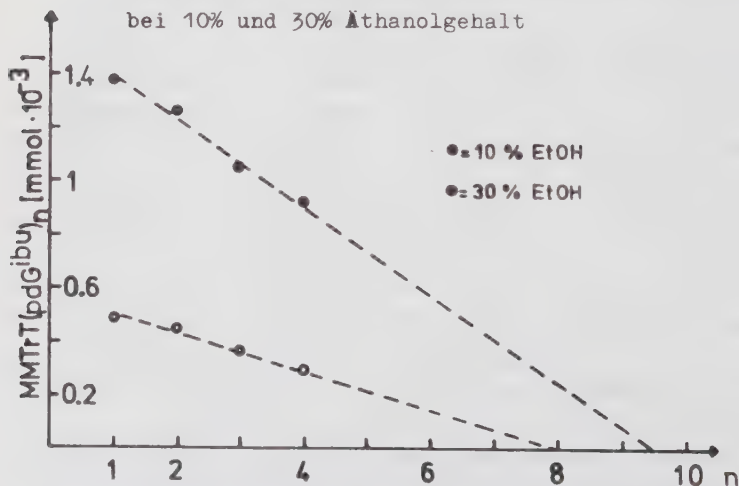
Alkoholgehalt wegen der schlechten Löslichkeit keine Kapazitätsbestimmung möglich war. Die Ergebnisse sind in Tab.5 zusammengefaßt.

Tab.5 : Affinität der Oligonucleotide $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n$ zu Tritylcellulose bei 10% und 30% Äthanolgehalt

	n	O.D. 260nm	O.D. 472nm	E_{260}/E_{472} gef. ber.	$\frac{\text{mmol} \cdot 10^{-3}}{\text{mmol Trityl-gruppen}}$	$\frac{\text{mmol} \cdot 10^{-3}}{\text{g Trityl-cellul.}}$
10% EtOH	1	37	76	0,48 0,46	1,38	3,29
	2	51,3	70	0,73 0,76	1,27	3,02
	3	58	58	1 1,07	1,05	2,5
	4	64	50	1,28 1,36	0,91	2,17
30% EtOH	0	35	205	0,17 0,16	3,93	9,36
	1	14	27	0,52 0,46	0,49	1,17
	2	19	25	0,76 0,76	0,45	1,07
	3	21,6	20,5	1,05 1,07	0,37	0,88
	4	21,2	16,6	1,28 1,36	0,3	0,71

Die grafische Darstellung der molaren Kapazitäten in Abhängigkeit von der Kettenlänge ist in Abb.10 enthalten.

Abb.10 : Cooligomere $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n$: Beladung der Tritylcellulose in Abhängigkeit von der Kettenlänge bei 10% und 30% Äthanolgehalt



Säulendimensionen und Elutionsbedingungen wie in Abb.9 angegeben (S.30)

Die erhaltenen Daten zeigen eine deutliche Abnahme der Affinität der Cooligomeren mit steigender Kettenlänge. In Abb.10 wurde daher versucht, durch die Extrapolation der Meßwerte auf die Beladung=0 die maximale Kettenlänge zu ermitteln, bei der noch eine Adsorption an Tritylcellulose stattfindet. Wenn eine lineare Extrapolation erlaubt sein sollte, dann würde dies ergeben, daß bei 10% Äthanolzusatz zum Eluans ab einer Kettenlänge von 10-11 und bei 30% Äthanolzusatz ab einer Kettenlänge von 8 keinerlei Adsorption mehr erfolgt. Der wahre Verlauf der Beladbarkeit ließe sich nur durch Messungen mit längererkettigen Oligonucleotiden ($n=5-10$) nachweisen, die für diese Untersuchungen nicht zur Verfügung standen. Da bei einer Cooligokondensation Oligonucleotide mit einer Kettenlänge >5 nicht in nennenswerter Ausbeute entstehen, sind diese Grenzwerte für die Affinitätstrennung nicht von Bedeutung. Die für kürzerkettige Cooligomere bestimmten Beladbarkeiten ermöglichen aber, die Dimensionierung einer Tritylcellulose-Säule für eine Affinitätstrennung zu berechnen. Allerdings muß dabei berücksichtigt werden, daß die hier ermittelten Daten Maximalwerte unter vollständiger Sättigung des Affinitätssorbens mit affiner Substanz darstellen. In einer Affinitätstrennung muß jedoch unterhalb dieser Sättigungsgrenze gearbeitet werden, um eine quantitative Zurückhaltung des affinen Anteils eines Cooligokondensationsgemisches zu gewähren. Wird eine zu klein dimensionierte Trennsäule benutzt, findet man eine falsche mittlere Kettenlänge der Cooligomeren, da die kürzerkettigen die bereits retardierten längererkettigen Oligonucleotide wieder von der Säule verdrängen, und somit eine Anreicherung der kürzerkettigen Oligomere stattfindet. So wurde z.B. bei der Überladung einer Tritylcellulose-Säule eine mittlere Kettenlänge der Cooligomeren von 1,9 gefunden, anstelle des richtigen Wertes von 2,3 .

Mit Hilfe der für den nicht-affinen und affinen Anteil getrennt erhaltenen Daten können nur exakte Angaben zur

Affinitätstrennung eines Reaktionsgemisches an Tritylcellulose gemacht werden, das aus einer Cokondensation von MMTrT mit pdG^{ibu} und $\text{pdG}_{\text{Ibu}}^{\text{ibu}}$ erhalten wurde. Solche Affinitätstrennungen werden im folgenden Abschnitt untersucht.

3.2.4. Affinitätschromatografische Trennung von Cooligokondensationsprodukten an Tritylcellulose

Wie die Versuche mit $\text{pdG}_{\text{Ibu}}^{\text{ibu}}$ zeigten, muß bei der Affinitätstrennung an Tritylcellulose ein Elutionspuffer verwendet werden, der mindestens 30% Äthanol enthält, um eine unerwünschte Reatardierung der Homooligomeren $(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n$ zu unterdrücken. Dadurch wird allerdings die Kapazität der Tritylcellulose für die Cooligomeren $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n$ stark eingeschränkt (vergl. Tab.5 auf S.32).

Die Dimensionierung der Trennsäule muß sich nach dem Anteil der tritylierten Cooligomeren und deren zu erwartender Kettenlängenverteilung richten. Für ein mmol Cooligomerenmischung, das z.B. aus 60% Dimeren, 30% Trimeren und 10% Tetrameren besteht, werden nach Tab.5 an Äquivalenten Tritylgruppen im Säulenmaterial mindestens benötigt:

1230 mÄquiv für das Dimere, 670 mÄquiv für das Trimere und 270 mÄquiv für das Tetramere; insgesamt also 2170 mÄquiv Tritylgruppen. Dies entspricht einer Menge von ca. 800 g und einem Volumen von ca. 3000 ml Säulenmaterial (bei einem Substitutionsgrad der Tritylcellulose von 1). Obige Kapazitätsangaben gelten aber nur bei einer vollständigen Sättigung der Tritylcellulose mit Cooligomeren (vergl. S.28), so daß zu einer quantitativen Affinitätstrennung etwa die doppelte Menge an Säulenmaterial eingesetzt werden muß. Als Faustregel gilt somit, daß für ein mmol der Cooligomerenmischung ca. 1600 g (= 6 l Säulenvolumen) Tritylcellulose zur Verfügung stehen muß. Um mit einer geringeren Menge an Affinitätsorbens auszukommen, ist es zweckmäßig, den Hauptanteil der Cooligomeren (also das Dimere) durch ein anderes Trennverfahren - z.B. durch Extraktion - aus der Mischung zu entfernen. Erfahrungsgemäß ist nach

Anwendung der Extraktion nur noch die Hälfte der oben angegebenen Menge an Tritylcellulose zur Affinitäts-trennung des restlichen Cooligomerengemisches ausreichend. Von Einfluß auf die Vollständigkeit der Affinitäts-trennung ist auch die Geschwindigkeit, mit der das Gemisch eingewaschen und eluiert wird. Bei zu hoher Elutionsgeschwindigkeit kann affines Material schon wieder die Trennsäule verlassen, bevor sich das Gleichgewicht zwischen gelöster und adsorbierter affiner Substanz eingestellt hat. Diese Gefahr besteht vor allem bei schwachen affinen Wechselwirkungen, die durch einen relativ hohen Wert der Dissoziationskonstante des Komplexes zwischen matrix-gebundenem Effektor und affiner Substanz charakterisiert werden. Von hoher Affinität spricht man bei Wechselwirkungen, deren Dissoziationskonstante $< 10^{-6}$ M beträgt. Abschätzungen der Größe der Dissoziationskonstante des Systems Tritylcellulose/MMTr-geschütztes Oligonucleotid liefern Werte zwischen $5 \cdot 10^{-2}$ und 2, je nach Äthanolgehalt und Kettenlänge (vergl. Fußnote). Es handelt sich hier also um eine sehr schwache Wechselwirkung, die auch den großen Überschuß an Tritylcellulose notwendig macht. Mit Elutionsgeschwindigkeiten von ca. $50 \text{ ml h}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (cm^2 =Säulenquerschnittsfläche) wurde stets eine quantitative Absonderung des affinen Anteils erreicht.

Eine typische Trennung eines Cooligokondensationsansatzes (mit MMTrT und $\text{dpG}_{(\text{Ibu})}^{\text{ibu}}$) nach Extraktion des Dimeren MMTrTpdG^{ibu} und des nicht umgesetzten MMTrT zeigt Abb. 11 S.36. Das Gemisch wurde in 30% Äthanol/0,05 M TBK-Puffer eingewaschen, und mit demselben Puffer der nicht-affine Anteil innerhalb des 3fachen Säulenvolumens abgetrennt. Durch Steigerung des Äthanolgehaltes auf 70%

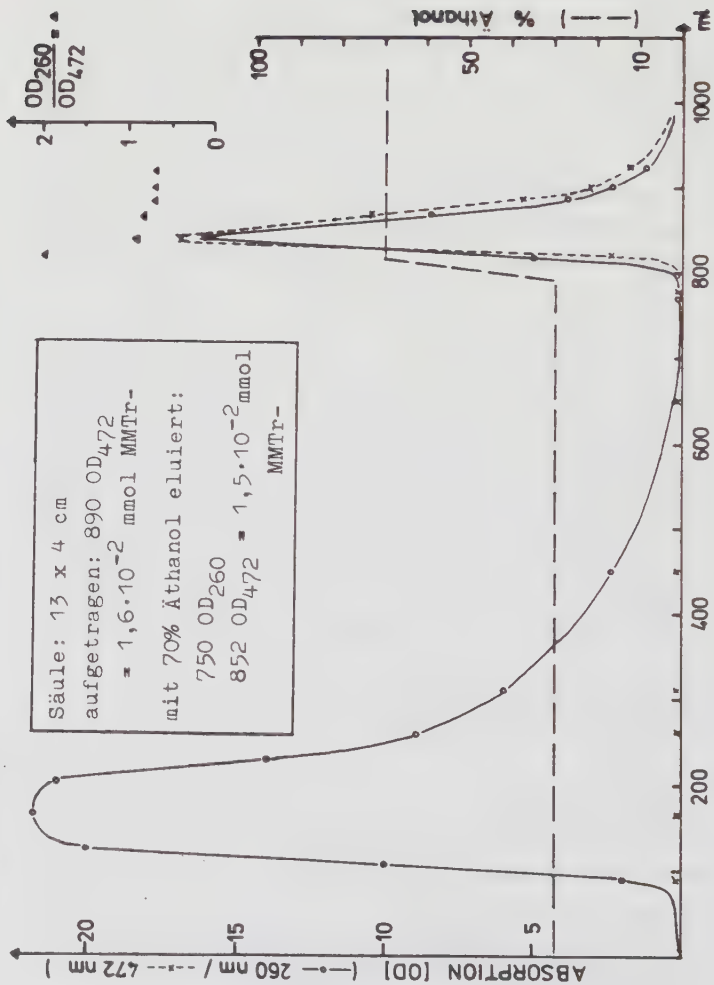
Für den Komplex AE - gebildet aus affiner Komponente A und immobilisiertem Effektor E - gilt nach 58:

$$K_{\text{AE}} = \frac{[\text{A}] \times [\text{E}]}{[\text{AE}]} = \frac{[\text{A}_0 - \text{AE}] \times [\text{E}_0 - \text{AE}]}{[\text{AE}]} \quad [\text{A}_0] \text{ und } [\text{E}_0] = \text{Anfangskonzentr.}$$

wenn $\text{E}_0 \gg \text{AE}$ dann gilt: $K_{\text{AE}} = \frac{[\text{A}_0 - \text{AE}]}{[\text{AE}]} \times [\text{E}_0]$

(eingesetzt: $\text{A}_0 = \text{ca. } 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; gemessen: $10^2 < \text{E}_0/\text{AE} < 10^4$)

Abb. 11 : Tritylcellulose-Trennung eines Cooligokondensationsansatzes nach Extraktion des Nucleosids MMTrT und des Dimeren MMTrTpdG^{ibu}.



wurden die retardierten Cooligomere wieder von der Säule eluiert.

Wie die vorausgegangenen Versuche (vergl. S.32) zeigten, werden Cooligomere mit größerer Kettenlänge schwächer retardiert als solche mit kleinerer Kettenlänge und sollten daher schneller von der Säule gewaschen werden. Dies wurde auch durch die Bestimmung des Extinktionsverhältnisses $E(260\text{nm})/E(472\text{nm})$ des Eluates bestätigt, welches bei den ersten Fraktionen des Äthanolgradienten am größten war und mit fortschreitender Elution auf einen Grenzwert absank, der durch das Oligomere mit der kleinsten Kettenlänge, das ja am stärksten retardiert wird, festgelegt ist. Versuche, diese Unterschiede im Elutionsverhalten zu einer Auftrennung der Cooligomeren nach Kettenlänge auszunutzen und auf diese Weise einen weiteren Trennschritt einzusparen, zeigten auch bei der Elution mit langsamer ansteigenden Äthanolgradienten keine wesentliche Verbesserung der Trennschärfe.

Da bei einer gleichzeitigen Auftrennung nach Affinität und Kettenlänge nicht nur der Arbeitsaufwand sondern auch Substanzverluste (z.B. durch unspezifische Adsorption an DEAE-Cellulose) verringert würden, wurde nach einem anderen Affinitätstrennmateriäl gesucht, das den oben genannten Anforderungen entspricht.

3.3. Trennversuche an Gelen mit hydrophoben Seitengruppen

An Gelen mit hydrophoben Seitengruppen sollten sich beide Trennprinzipien in einem einzigen Elutionsschritt verwirklichen lassen - die Affinitätschromatografie mit Hilfe des hydrophoben Effektors (=Substituent der Gelmatrix)

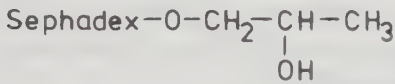
und die Trennung nach Kettenlänge durch den Molekularsiebeffekt des Gels.

Eine gelchromatografische Trennung nach Kettenlänge von Triester-Desoxyoligonucleotiden an einem hydrophoben Gel wurde von LETSINGER⁵⁹ beschrieben. Da die Trennung dieser ungeladenen Triester mit einem organischen Elutionsmittel erfolgte, wurden hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Gel und Oligonucleotiden ausgeschlossen oder zumindest stark zurückgedrängt, so daß allein der Molekularsiebeffekt die Trennung bewirkte.

Ebenfalls von LETSINGER u. Mitarb.⁶⁰ wurden Trennungen von Diester-Oligonucleotiden an dem hydrophobierten Gel Sephadex LH 20 durchgeführt. Aber auch hier wurde mit einem organischen Elutionsmittel (95% Äthanol) gearbeitet, da die Oligonucleotide mit stark hydrophoben Schutzgruppen substituiert waren; hydrophobe Wechselwirkungen beeinflussten also nicht die Trennung. Diester-Oligonucleotide mit weniger hydrophoben Schutzgruppen müssen dagegen in überwiegend wässriger Lösung chromatografiert werden, so daß hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Gel und Oligonucleotid auftreten können, die sich der gelchromatografischen Trennung überlagern. Besitzen die Oligonucleotide pro Molekül nur eine stark hydrophobe Schutzgruppe (z.B. MMTr-), so wird mit wachsender Kettenlänge die Affinität zum hydrophobierten Gel abnehmen (vergl. Tritylcellulose S.32). Längerkettige Oligonucleotide sollten daher schwächer retardiert werden als kürzerkettige. Auf Grund des Molekularsiebeffektes werden längerkettige ebenfalls vor den kürzerkettigen Oligonucleotiden eluiert. Die Trennung nach Kettenlänge sollte also durch die unterschiedliche Affinität zum Gel nicht verschlechtert, sondern eher verbessert werden.

Als Säulenmaterial für solche Trennungen erschien Sephadex LH gut geeignet, da es zum einen durch seine hydrophile Gelmatrix in wässrigen Lösungsmitteln gut

quellbar ist, zum anderen in der aliphatischen Seitenkette einen Effektor besitzt, welcher eine hydrophobe Chromatografie ermöglichen sollte:

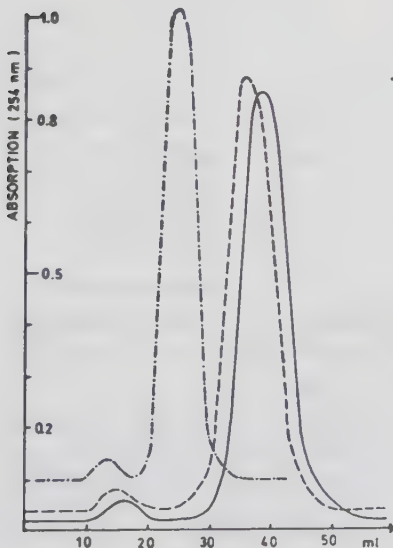


Sephadex LH
(-hydroxypropylier-
tes Sephadex)

Für die Trennung der homologen Reihe $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n$ wurde Sephadex LH 60 verwendet, um möglichst auch die Oligomeren mit einer Kettenlänge >3 trennen zu können. Mit dem stärker vernetzten Sephadex LH 20 gelang LETSINGER⁶⁰ eine gute Trennung nur bis zum Trimeren.

Um nachzuweisen, daß tritylierte Oligonucleotide durch hydrophobe Wechselwirkungen am Gel retardiert werden, wurde das Elutionsvolumen des Trimeren $\text{MMTrTpdG}^{\text{ibu}}_{\text{pdG}^{\text{ibu}}}$ an Sephadex LH 60 bei verschiedenen Alkoholgehalten des Elutionspuffers gemessen, die Elutionsdiagramme sind in Abb.12 wiedergegeben.

Abb.12 : Gelchromatografie von $\text{MMTrTpdG}^{\text{ibu}}_{\text{pdG}^{\text{ibu}}}$ an Sephadex LH 60



— = 20% MeOH $V_{\text{el}} = 35 \text{ ml}$
 --- = 20% EtOH $V_{\text{el}} = 39 \text{ ml}$
 - · - = 40% MeOH $V_{\text{el}} = 24 \text{ ml}$

Säulendimensionen:

20 x 1 cm = 15,7 ml

Ausschlußvolumen für
Dextranblau:

$V_0 = 4,5 \text{ ml}$

$\text{MMTrTpdG}^{\text{ibu}}_{\text{pdG}^{\text{ibu}}}$ ein-
gewaschen jeweils:

$16 \text{ OD}_{260} = 8 \cdot 10^{-4} \text{ mmol}$

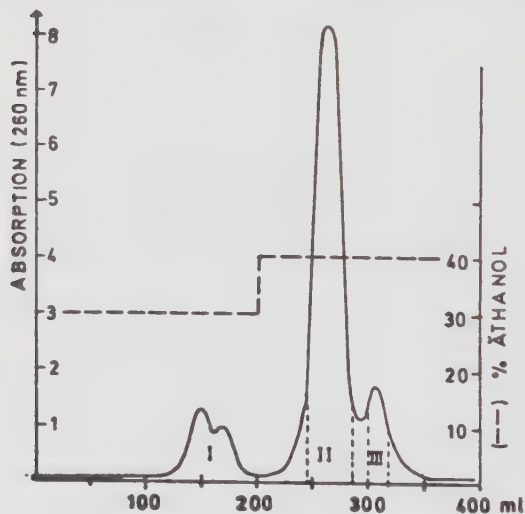
Elutionspuffer :

% Alkohol / 0,1 M TBK

Aus Abb.12 wird deutlich, daß das Trimere $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_2$ durch hydrophobe Wechselwirkungen am Gel retardiert wird, da das Elutionsvolumen deutlich über dem Gesamtvolumen des Säulenbettes liegt und eine Steigerung des Alkoholgehaltes oder die Verwendung des stärker hydrophoben Äthanols anstelle des hydrophileren Methanols eine Verringerung des Elutionsvolumens bewirkt.

Es sollte somit möglich sein, mit diesem Säulenmaterial nicht nur nach Kettenlänge sondern auch nach unterschiedlichem hydrophoben Charakter zu trennen. Dies konnte bei der Aufreinigung eines, in schrittweiser Synthese durch Extraktion gewonnenen Trimeren gezeigt werden; das $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_2$ wurde weitgehend von Nebenprodukten abgetrennt, wie Abb.13 zeigt.

Abb.13 : Aufreinigung von $\text{MMTrTpdG}^{\text{ibu}}_2$ an Sephadex LH 60

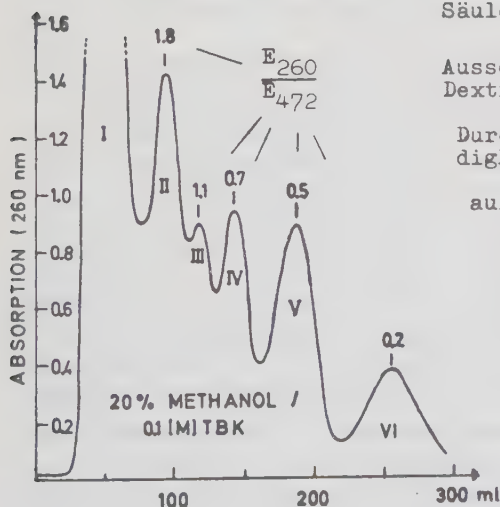


Elutions-
puffer:
EtOH/0,1 M TBK
Säule:
3,3 x 19 cm
= 160 ml
Ausschlußvolu-
men für
Dextranblau:
 $V_0 = 42$ ml
aufgetragen:
ca. 370 OD₂₆₀

- I : Kondensationsmittel und pdG^{ibu}
 II : $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_2$ (262 OD₂₆₀) = ca. $6 \cdot 10^{-3}$ mmol
 III : $\text{MMTrTpdG}^{\text{ibu}}$ (38 OD₂₆₀) = ca. $1,5 \cdot 10^{-3}$ mmol

Das Trennprofil in Abb.13 zeigt, daß nicht nur die nicht-affinen Komponenten, pdG^{ibu} und Kondensationsmittel, abgetrennt worden sind, sondern daß auch der affine Anteil in Trimeres und Dimeres aufgetrennt worden ist. Nun konnte auch geprüft werden, ob sich eine Cooligomerenmischung $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n$ (mit $n \geq 0$) sowohl von den durch eine teilweise Abspaltung der MMTr -Schutzgruppe entstandenen Oligomeren $\text{T}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n$ abtrennen als auch nach Kettenlänge auftrennen läßt. Die Gelchromatografie dieser Mischung ist in Abb.14 dargestellt:

Abb.14 : Auftrennung von verunreinigten $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n$ auf Sephadex LH 60



Säule: 1,7 x 38 cm
= 86 ml

Ausschlußvolumen für
Dextranblau : 23 ml = V_0

Durchflußgeschwin-
digkeit: 15 ml/h

aufgetragen: 250 OD₂₆₀

- I : $\text{T}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n$
 II: $\text{T}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n$ u.
 $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_{3-4}$
 III: $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_3$ + II
 IV: $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_2$
 V: $\text{MMTrTpdG}^{\text{ibu}}$
 VI: MMTrT

Die Charakterisierung der Fraktionen, die MMTr -Gruppen enthielten, also der vollständig geschützten Co-oligomeren, erfolgte durch die Bestimmung des Extinktionsverhältnisses E_{260}/E_{472} (vergl.S.31) . Eine, allerdings nicht sehr gute, Trennung wurde nur bis zum Trimeren (IV) erreicht, schon das Tetramere(III) wurde von den Fraktionen, die keine tritylierten Substanzen

enthielten, überlagert. Eine vollständige Trennung der tritylierten von den nicht-tritylierten Oligomeren ließ sich nicht erreichen, da auch die Oligomere des Typs $T(pdG^{ibu})_n$ durch unspezifische (wohl auch hydrophobe) Wechselwirkungen am Gel retardiert werden; das Elutionsvolumen des Monomeren pdG^{ibu} entsprach schon dem Gesamtvolumen der Trennsäule.

Mit einer längeren Trennsäule sollte aber die Trennung der Cooligomeren unterhalb des Pentameren gelingen. Benötigt man die Cooligomeren nur bis zum Tetrameren, so bietet die "hydrophobe Gelchromatografie" die Möglichkeit, die gewünschten Cooligomeren direkt und schnell aus dem Kondensationsansatz zu isolieren.

Als generelle Trennmethode auch für die Reindarstellung längererkettiger Oligomere erschien dieser Weg jedoch nicht gangbar, so daß Affinitätstrennung und Trennung nach Kettenlänge weiterhin in zwei Schritten erfolgen mußte.

4. Auftrennung der Cooligomeren nach Kettenlänge

Außer der beschränkten Möglichkeit, Cooligomere des Typs $MMTrT(pdG^{ibu})_n$ auf Sephadex LH 60 Gel nach Kettenlänge zu trennen, stand uns keine alternative Trennmethode gegenüber der am häufigsten gebrauchten Ionenaustauscherchromatografie an DEAE-Cellulose zur Verfügung.

Die Trennung dieser Cooligomeren über DEAE-Cellulose erfolgt zwar streng nach ansteigender negativer Ladung, wird aber gleichzeitig immer unschärfer, da sich die Oligomeren in ihrer negativen Gesamtladung relativ immer weniger voneinander unterscheiden. Zusätzlich überlagern nicht-ionische Wechselwirkungen zwischen Cooligomeren und DEAE-Cellulose die Trennung auf Basis der Ionenbeziehung. Diese nicht-ionischen Wechselwirkungen verursachen eine verstärkte Retardierung der mit $MMTr-$

und anderen hydrophoben Gruppen geschützten Oligonucleotide am Säulenmaterial, die auch zur Abtrennung tritylierter von nicht-tritylierten Oligonucleotiden bei Blockkondensationen ausgenutzt werden konnte (z.B. SCHOTT u. KÖSSEL⁶¹). Bei der Auftrennung einer homologen Reihe von Cooligomeren verursachen aber die nicht-ionischen Wechselwirkungen eine Verminderung der Trennschärfe durch die Verbreiterung der Peaks. Um diesen unerwünschten Nebeneffekt zurückzudrängen, setzt man dem wässrigen Elutionspuffer ein organisches Lösungsmittel zu.

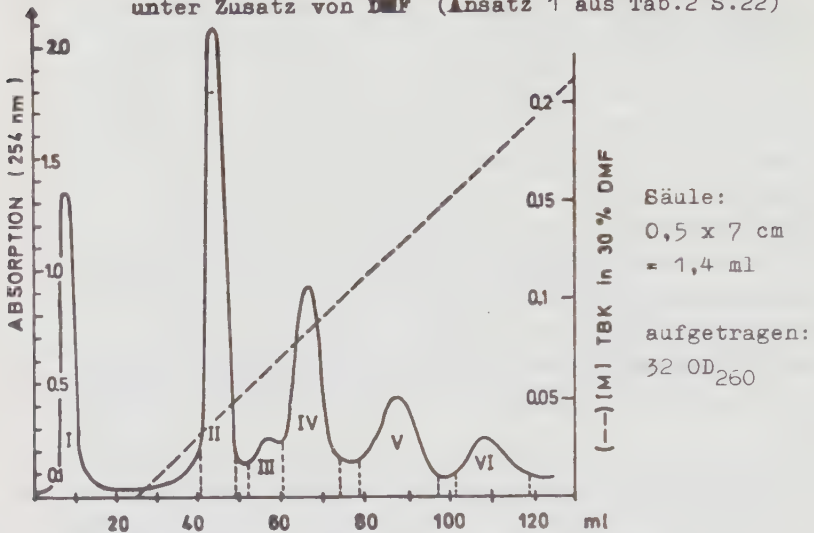
Dazu wurden DEAE-Trennungen mit verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt, die nachfolgend beschrieben werden.

4.1. DEAE-Cellulose Trennungen unter Zusatz von DMF

Ein günstiger Zusatz zum Elutionspuffer schien DMF zu sein, da es neben den nicht-ionischen Wechselwirkungen zwischen DEAE-Cellulose und Oligonucleotiden auch eine mögliche Assoziation der Oligonucleotide durch H-Brücken zwischen den Nucleobasen zurückdrängen und dadurch die Trennschärfe verbessern sollte. Trennungen in analytischem Maßstab (10-30 OD₂₆₀), wie in Abb.14 S.44 gezeigt, gelangen mit ausgezeichneter Trennschärfe und exakter Reproduzierbarkeit. In größerem Maßstab (ca. 2000 OD₂₆₀) wurden ebenfalls gute Trennungen durchgeführt, aber die Entfernung des relativ schwerflüchtigen DMF durch mehrmaliges Abziehen im Ölpumpenvakuum war bei größeren Ansätzen praktisch kaum noch möglich. Gleiches gilt für N-Methylpyrrolidon, das in der Diplomarbeit als Pufferzusatz verwendet wurde.

Bei größeren Ansätzen mußte daher ein organisches Lösungsmittel zugesetzt werden, das sich leicht und unter schonenden Bedingungen aus dem Elutionspuffer entfernen läßt.

Abb.14 : Trennung von $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n$ auf DEAE-Cellulose unter Zusatz von DMF (Ansatz 1 aus Tab.2 S.22)



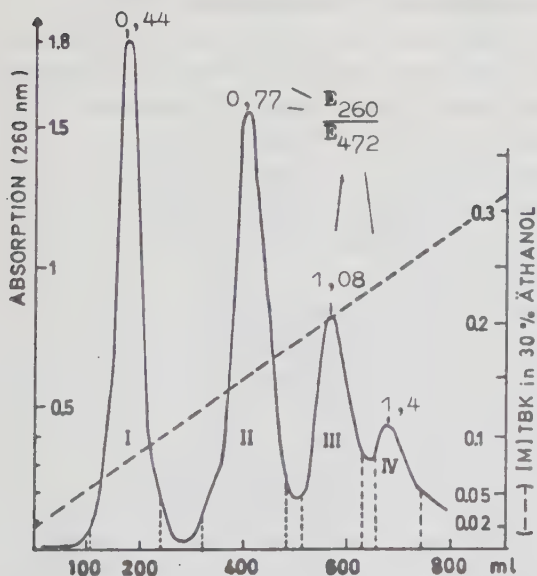
- | | |
|---|--|
| I : MMTrT (3,5 OD ₂₆₀) | IV: $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_2$ (7,9 OD) |
| II : $\text{MMTrTpdG}^{\text{ibu}}$ (9,6 OD ₂₆₀) | V: $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_3$ (5,3 OD) |
| III: $\text{MMTrT}(\text{pdG})_2$? (1,2 OD ₂₆₀) | VI: $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_4$ (2,7 OD) |

4.2. DEAE-Cellulose Trennungen mit Äthanol-Zusatz

Äthanol wird üblicherweise dem Puffer als organisches Lösungsmittel zugesetzt, um Oligonucleotide, die hydrophobe Schutzgruppen enthalten, an DEAE-Cellulose zu trennen. Versuche mit analytischen Trennsäulen zeigten, daß die Auftrennung der Cooligomeren $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n$ mit einem Zusatz von Äthanol ähnlich der Trennung mit DMF-Zusatz erfolgte, nur konnte nicht die gleiche Trennschärfe erreicht werden, da eine gewisse Peakverbreiterung gegenüber den Trennungen mit DMF zu beobachten war. Dieser Nachteil wird aber dadurch ausgeglichen, daß das Äthanol unter wesentlich schonenderen Bedingungen als das DMF entfernt werden kann. Eine solche Trennung eines Cooligomerengemisches $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n$ nach Extraktion des

restlichen MMTrT und teilweiser Extraktion des Dimeren ist in Abb.15 dargestellt:

Abb.15 : DEAE-Cellulose Trennung von MMTrT(pdG^{ibu})_n unter Äthanol-Zusatz (Ansatz 8 aus Tab.2 S.22)



Säule:

2,5 x 13 cm
= 63 ml

aufgetragen:

420 OD₂₆₀

Durchfluß:

64 ml/h

Rückgewinnung:

82%

I : MMTrTpdG^{ibu} (83 OD₂₆₀) III:MMTrT(pdG^{ibu})₃ (90 ")
II: MMTrT(pdG^{ibu})₂ (132 ") IV:MMTrT(pdG^{ibu})₄ (38 ")

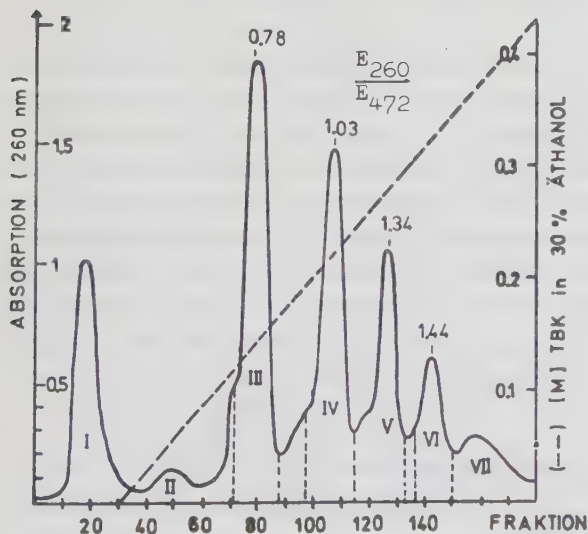
Wie in Abschnitt 3.2.4. deutlich wurde, werden zur Affinitätstrennung große Mengen an Tritylcellulose benötigt, so daß die vorherige Abtrennung eines Hauptteils der affinen Komponenten eine wichtige Zeit- und Materialersparnis auch im Hinblick auf die nachfolgende DEAE-Trennung bedeuten würde. In der schrittweisen Synthese von Oligonucleotiden werden seit einiger Zeit Extraktionsmethoden anstelle aufwendiger DEAE-Trennungen zur Gewinnung kurzkettiger Oligomere eingesetzt. Dies wurde durch die Einführung stark hydrophober Schutzgruppen

in die 3'-OH-Komponente (s. Schema 1 S.12) eines Kondensationsansatzes möglich, wie z.B. der MMTr- bzw. DMTr-Schutzgruppe für die 5'-OH-Gruppe und der p-Triphenylmethyl-anilin-⁶² oder der 2-(p-Tritylphenyl)-thioäthanol⁴¹-Schutzgruppe für die Phosphatgruppe. Bei diesen Extraktionsverfahren wird so vorgegangen, daß zuerst die hydrophobierte Ausgangskomponente mit einem geeigneten organischen Lösungsmittel und dann das Endprodukt mit einem anderen Lösungsmittel aus dem wässrigen Kondensationsgemisch extrahiert wird. Unsere Extraktionsversuche mit Cooligokondensationsgemischen wurden mit den gleichen Lösungsmittelsystemen durchgeführt, wie sie auch von AGARWAL et al.⁴¹ in der schrittweisen Synthese benutzt worden waren. Vor der Extraktion wurde der Kondensationsansatz jedoch einer partiellen alkalischen Hydrolyse unterworfen, um zu erreichen, daß alle Oligomere ein freies 3'-Hydroxylende besitzen. Dadurch sollte verhindert werden, daß Cooligomere mit gleicher Kettenlänge aber unterschiedlichem hydrophoben Charakter im Gemisch vorhanden sind. Aus dem Kondensationsgemisch, das in wässrigem Puffer (ca. 0,05 M TBK) gelöst war, wurde zunächst das nicht-umgesetzte Nucleosid MMTrT nahezu quantitativ mit Diäthyläther extrahiert. Durch die anschließende mehrfache Extraktion mit Essigester konnte der größte Teil des Dimeren MMTrTpdG^{ibu} sowie ein Teil des hydrolysierten Kondensationsmittels (Mesitylen- bzw. Triisopropylbenzolsulfonsäure) aus der wässrigen Phase entfernt werden. Das Kondensationsmittel, das in der Essigesterphase vorhanden war, wurde mit wässrigem Puffer wieder rückextrahiert. Die vollständige Extraktion des Dimeren erfolgte dann mit einer Mischung aus Essigester und n-Butanol (9:1 oder 8:2). Die Extraktion des reinen Trimeren mit CHCl₃ oder Essigester/n-Butanol (7:3) analog der schrittweisen Synthese gelang nicht, da stets auch höhere Cooligomere mitextrahiert wurden. Es erscheint für das Cooligokondensationsverfahren

auch ausreichend, wenn Nucleosid und Dimeres durch ein schnelles Trennverfahren - z.B. durch Extraktion - entfernt werden können. Hierdurch werden nur noch ca. 50% der relativen Menge an Tritylcellulose und DEAE-Cellulose benötigt. Bei Cooligokondensationen mit anderen Nucleosiden bzw. Nucleotiden könnte eine Abtrennung durch Extraktion auch bis zum Trimeren möglich sein.

Eine Auftrennung der Cooligomeren $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n$ auf DEAE-Cellulose nach der Extraktion des Nucleosids und des Dimeren ist in Abb.16 wiedergegeben.

Abb.16 : DEAE-Trennung von $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n$ nach Extraktion von MMTrT und $\text{MMTrTpdG}^{\text{ibu}}$ (Ansatz 7 aus Tab.2 S.22)



Säule:

2,8 x 45 cm
= 280 ml

aufgetragen:
1450 OD₂₆₀
in Pyridin/
0,02 M TBK

Elution:

22 ml/Fraktion
53 ml/h

I : Pyridin

II : $\text{MMTrTpdG}^{\text{ibu}}$ (17 OD₂₆₀)

III : $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_2$ (468 ")

IV : $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_3$ (365 ")

V : $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_4$ (239 OD₂₆₀)

VI : $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_5$ (102 ")

VII : nicht identifiziert

Die leichte Verbreiterung im Anstieg der Peaks kann durch eine teilweise Abspaltung der Basen-Schutzgruppen verursacht worden sein.

Die sehr kleine Menge an Substanz in Peak II beweist, daß die Extraktion des Dimeren nahezu quantitativ erfolgt war.

Die Trennung der Cooligomeren nach Kettenlänge konnte also mit ausreichender Trennschärfe auf DEAE-Cellulose auch mit einem Puffer durchgeführt werden, der einen Zusatz von Äthanol enthielt; ein kritischer Punkt war jedoch die Rückgewinnung allen aufgegebenen nucleotidischen Materials. Während von den kleinen DEAE-Säulen (<10 ml Säulenvolumen) praktisch alles Material wieder eluiert wurde, konnte bei den größeren Säulen (200-300ml) nur 70 - 80% der eingesetzten Menge zurückgewonnen werden. Um diese Verluste möglichst gering zu halten, muß die Kapazität der DEAE-Cellulose gut ausgenutzt werden. Eine daraus resultierende Verschlechterung der Trennschärfe ließe sich durch eine verbesserte Elutionstechnik, z.B. durch den Einsatz eines automatischen Gradientenreglers⁶³, weitgehend vermeiden. Eine andere Trennmethode bietet sich in der Reversed Phase HPLC an, mit der eine schnellere und bessere Trennung als mit DEAE-Cellulose erreicht werden kann (FRITZ u.Mitarb.⁴⁰). Beide Techniken standen uns aber nicht zur Verfügung, so daß Verluste bei der Auftrennung der Cooligomeren nicht zu umgehen waren.

4.3. Charakterisierung der geschützten und ungeschützten Cooligomeren durch UV-spektroskopische und chromatografische Daten

Zur Bestimmung der UV-Spektren der 5'- und basengeschützten Cooligomeren $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n$ wurden die Fraktionen im Maximum der entsprechenden Peaks einer DEAE-Trennung gegen den Elutionspuffer als Referenz gemessen. Die Messung der Extinktion bei 472 nm in 70% HClO_4 wurde zur Bestimmung des Extinktionsverhältnisses E_{260}/E_{472} durchgeführt, wodurch ein Hinweis auf die Kettenlänge des

Oligomeren erhalten wurde. Die Daten der vollständig geschützten (außer dem 3'-Ende) Cooligomeren $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n$ sind in Tab.6 zusammengestellt. Eine weitere Charakterisierung und Reinheitsprüfung erfolgte durch Papierchromatografie; die dabei ermittelten R_f -Werte sind ebenfalls in Tab.6 enthalten.

Tab. 6 : UV-Daten und R_f -Werte von $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n$

n	λ_{max} (nm)	λ_{min} (nm)	$\frac{E(260)}{E(280)}$	$\frac{E(260)}{E(472)}$	R_f rel. zu pT Laufmittel A B	
1	262	242	1,38	0,47	2,9	5,2
2	259	227	1,41	0,74	2,1	4,5
3	260	229	1,39	1,03	2,0	
4	258	228	1,46	1,29	1,86	
5	258	229	1,46	1,61	1,75	

Die Abspaltung der Basenschutzgruppen erfolgte mit konz. Ammoniak-Lösung, die daraus resultierenden, nur noch am 5'-Ende geschützten Oligomere $\text{MMTrT}(\text{pdG})_n$ wurden auch papierchromatografisch untersucht. Die R_f -Werte dieser Substanzreihe wurden nur bis zum Tetrameren genau bestimmt, da die höheren Oligomere stark verschmierte Flecken ergaben (wohl durch Assoziate verursacht), siehe dazu Tab.7.

Tab.7 : $\text{MMTrT}(\text{pdG})_n$: R_f -Werte in Laufmittel A und C

n	R_f rel. zu pT A C	
1	0,8	2,06
2	0,72	1,62
3	0,27	1,25

Nach Abspaltung der 5'-MMTr-Schutzgruppe mit 80% Essigsäure⁶⁴ wurde wieder eine Papierchromatografie durchgeführt. Die Substanzflecken wurden mit verdünntem Puffer (pH=7.5) eluiert und aus dem Eluat die UV-Spektren (als Referenz: Eluat eines Blindflecks) aufgenommen. In Tab.8 sind diese Daten der ungeschützten Cooligomeren zusammengefaßt.

x) Angabe der Laufmittelzusammensetzung im experiment. Teil

Tab.8 : UV-Daten u. R_f -Werte der ungeschützten Cooligomeren $d-T(pG)_n$

n	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\lambda_{\min}$ (nm)	$\frac{E(260)}{E(280)}$	R_f rel. zu pT Laufmittel C
1	265	230	1,54	1,12
2	255	227	1,60	0,75
3	254	227	1,62	0,47 0,05
4	254	226	1,58	0,28

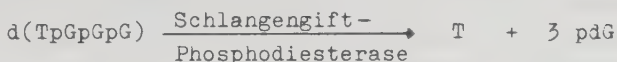
Die Papierchromatografie des ungeschützten Tetrameren $d-TpGpGpG$ zeigte zwei Flecker in LM C mit R_f -Werten (rel. zu pT) von 0,47 bzw. 0,05. Die UV-Spektren der eluierten Produkte waren identisch, ebenso lieferte die enzymatische Analyse mit Schlangengift-Phosphodiesterase (s. 4.4.) für beide Substanzen den gleichen Wert von ca. 1:3 für das Verhältnis $dT:pdG$. Daraus mußte geschlossen werden, daß es sich beidesmal um das gleiche Oligonucleotid handelte. Der Fleck mit dem extrem niedrigen R_f -Wert wurde demnach durch Assoziationen des Tetrameren verursacht, was durch die Dünnschichtchromatografie auf PEI-Cellulose Folien^{+) unter denaturierenden Bedingungen (Zerstörung von H-Brücken zwischen den Oligomeren durch Zusatz von Harnstoff) bestätigt wurde. Beide Produkte besaßen den gleichen R_f -Wert und somit auch die gleiche Kettenlänge. Bei Oligomeren mit einem $n < 3$ wurde dieser Effekt nicht beobachtet, aber auch beim Pentameren schienen sich wesentlich weniger Assoziate gebildet zu haben.}

4.4. Enzymatische Analyse der Cooligomeren $d-T(pG)_n$

Die Zusammensetzung der synthetisierten Cooligomeren wurde durch enzymatische Hydrolyse der über Papierchromatografie aufgereinigten, ungeschützten Oligonucleotide mit Schlangengift-Phosphodiesterase geprüft. Dieses Enzym spaltet Oligonucleotide vom 3'-OH-Ende aus in Nucleosid-5'-monophosphate und, falls das Oligonucleotid

^{+) PEI = Polyethyleneimin}

am 5'-Ende eine Hydroxylgruppe trägt, in das endständige Nucleosid, wie an Hand des Tetrameren d(TpGpGpG) in Schema 6 gezeigt wird .



Schema 6

Die quantitative Bestimmung der Spaltprodukte T und pdG gestattet im Fall der hier eingesetzten Cooligomeren d-T(pG)_n die Ermittlung der Zahl n und somit auch der Kettenlänge des Oligomeren. Die hierbei gefundenen Verhältnisse von dT:pdG bestätigten die durch Messung des Extinktionsverhältnisses 472/260 nm bei vollständig geschützten Oligomeren (vergl. Tab.5 , S.32) berechneten Kettenlängen. Die Ergebnisse dieser Enzymspaltungen sind in Tab.9 angegeben.

Tab.9 : Enzymspaltungen der ungeschützten Cooligomeren d-T(pG)_n mit Schlangengift-Phosphodiesterase

Oligomeres	dT:pdG ber.	dT:pdG gef.
d-TpG	1 : 1	1 : 1,2
d-TpGpG	1 : 2	1 : 2,1
d-TpGpGpG	1 : 3	1 : 2,8
d-TpGpGpGpG	1 : 4	1 : 3,7

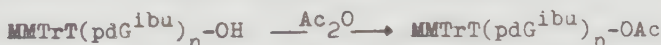
Die vollständige Spaltung aller Cooligomeren durch das Enzym zeigt die gewünschte Verknüpfung der Monomeren durch eine 3'-5'-Phosphodiesterbindung.

5. 5'-Phosphorylierung von Oligonucleotiden

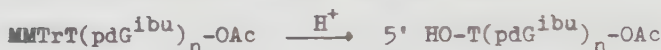
Zwei der durch Cooligokondensation gewonnenen Baublöcke das Tetramere und das Trimere sollten in einer Blockkondensation zu einem Heptameren verknüpft werden. Dazu benötigt man einen Baublock mit freier 3'-OH-Gruppe und einen anderen mit einer 5'-Phosphatgruppe, alle anderen reaktiven Gruppen müssen geschützt sein.

Aus dem in dieser Arbeit angewendeten Cooligokondensationsverfahren resultieren Cooligomere des Typs $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n\text{-OH}$. Um daraus einen am 5'-Ende phosphorylierten Block des Typs $5'\text{-p-T}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n\text{-OR}$ (R-Schutzgruppe) zu gewinnen, müssen folgende Reaktionsstufen durchgeführt werden (Schema 7).

1. Schutz der 3'-OH-Gruppe durch Acylierung:



2. Abspaltung der 5'-MMTr-Schutzgruppe:



3. Phosphorylierung der 5'-OH-Gruppe :



Schema 7

5.1. Schutz der 3'-OH-Gruppe

Um eine nicht erwünschte 3'-Phosphorylierung zu vermeiden, muß vor der Abspaltung der 5'-Schutzgruppe und der anschließenden Phosphorylierungsreaktion die freie 3'-OH-Funktion quantitativ blockiert werden. Am geeignetsten erschien dafür eine Acylierung mit Acetanhydrid, da sie schnell und praktisch quantitativ verläuft^{64,65}. Die Einführung der stabileren Isobutyrylgruppe benötigt längere Reaktionszeiten und bietet auch keine Vorteile, da meist nach der Phosphorylierung (s.S.56) eine alkalische Partialhydrolyse erfolgt, bei der auch die 3'-OH-Schutzgruppe angegriffen wird.

Die Vollständigkeit der 3'-Acetylierung läßt sich allerdings chromatografisch kaum bestimmen, da die Unterschiede im R_f -Wert zwischen vollständig geschützten und 3'-OH-ungeschützten Oligomeren bei Kettenlängen > 2 zu gering sind. UV-spektroskopisch lassen sich auch keine Unterschiede feststellen. Ein geringer Teil an freien

3'-Hydroxylgruppen sollte aber nicht stören, da die bei der Phosphorylierung eventuell entstehenden Nebenprodukte in dem ohnehin notwendigen Aufreinigungsschritt abgetrennt würden. Die Umsetzung des Cooligomeren mit Acetanhydrid erfolgte in Pyridin, welches nach Reaktionsende zusammen mit überschüssigem Pyridiniumacetat abgezogen wurde. Das zurückbleibende 3'-acetylierte Oligomere wurde direkt zur Abspaltung der 5'-MMTr-Schutzgruppe eingesetzt.

5.2. Abspaltung der 5'-MMTr-Schutzgruppe

Zur Freisetzung der 5'-OH-Gruppe wird die MMTr-Gruppe bei Raumtemperatur mit 80% Essigsäure innerhalb von 40-50 min abgespalten⁶⁴. Bei dG und dA enthaltenden Oligonucleotiden besteht dabei die Gefahr einer Depurinierung unter Spaltung der N-glykosidischen Bindung. Diese Nebenreaktion soll sich bei der Abspaltung mit Benzolsulfonsäure in organischen Lösungsmitteln nach NARANG³⁸ unterdrücken lassen. Wegen der unzureichenden Löslichkeit der Diester-Oligomere in organ. Lösungsmitteln ist diese Methode nur bei Triester-Oligomeren anwendbar.

Da im Verlauf eines Sequenzaufbaues unter Hilfe des Co-oligokondensationsverfahrens aber maximal zwei Abspaltungen an derselben Oligonucleotidkette notwendig werden, sollte die Behandlung mit Essigsäure nur wenig depuriertes Material liefern.

Nach Reaktionsende wurde die Essigsäure abgezogen und das freigesetzte MMTr-OH in Äther extrahiert. Eine schnelle Aufreinigung wurde auch durch Gelfiltration an Bio-Gel P-2 Säulen erzielt. Das so erhaltene Produkt konnte dann sofort zur Phosphorylierung eingesetzt werden.

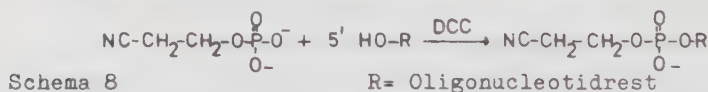
5.3. Methoden zur 5'-Phosphorylierung von geschützten Oligonucleotiden

Die Phosphorylierung der 5'-terminalen Hydroxylgruppe eines Oligonucleotides sollte mit hohen Ausbeuten und einem Minimum an Nebenreaktionen verlaufen, um möglichst

wenig des wertvollen Zwischenproduktes zu verlieren. Diese Forderung läßt sich nur durch eine enzymatische Phosphorylierung mit dem Enzym Polynucleotid Kinase⁶⁶ verwirklichen, welches nicht nur ungeschützte sondern auch basengeschützte Oligonucleotide nahezu quantitativ phosphoryliert⁶⁷. Bedingt durch den hohen Preis des Enzyms wird diese Methode nur in analytischem Maßstab (pmol-nmol) zur Einführung einer 5'-terminalen radioaktiven ³²P-Phosphatgruppe eingesetzt.

Viele der in der Literatur beschriebenen Methoden zur chemischen Phosphorylierung, wie z.B. mit 2-(N,N-Dimethyl-amino)-4-nitrophenylphosphat⁶⁸ oder Bis-(o-nitrobenzyl)-phosphorylchlorid⁶⁹, eignen sich wegen der harten Bedingungen zur Freisetzung der 5'-Phosphatgruppe nicht zur Phosphorylierung von geschützten Oligonucleotiden.

Eine besonders milde Methode ist hingegen die Phosphorylierung nach TENER⁷⁰ mit β -Cyanoäthylphosphat (β -CEP) unter der Einwirkung des Kondensationsmittels DCC, die in Schema 8 dargestellt ist.



Dieser Weg wurde daher zunächst zur Phosphorylierung des trimeren Oligonucleotid-Blocks eingeschlagen. Alternativ wurde die von KÖSTER^{71,72} beschriebene direkte Phosphorylierung mit POCl₃ untersucht, die bei Nucleosiden gute und bei Oligonucleotiden ausreichende Ausbeuten (50-60%) ergeben soll.

5.4. 5'-Phosphorylierung von 5'-HO-TpdG^{ibu}_{pdG^{ibu}_{Ac}} mit β -Cyanoäthylphosphat

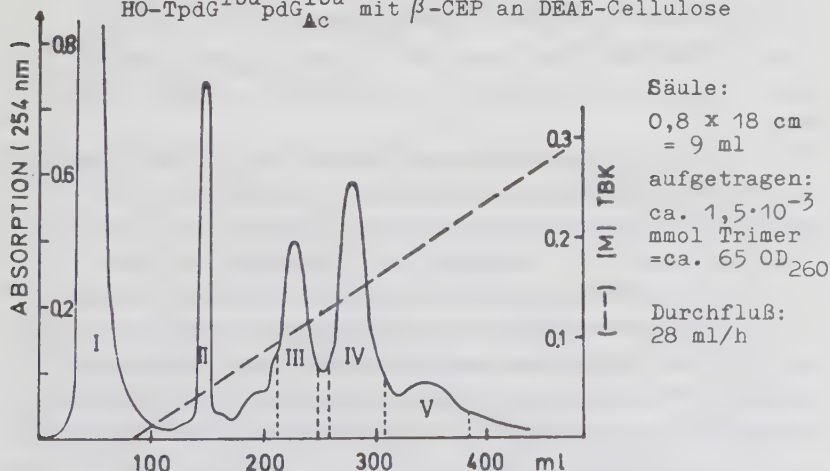
Die meisten der in der Literatur beschriebenen Phosphorylierungen mit β -Cyanoäthylphosphat^{73,74,75} wurden mit DCC als Kondensationsmittel durchgeführt. Eine von uns als Test durchgeführte Phosphorylierung der 3'-Hydroxylgruppe von 5'-MMTrT mit β -Cyanoäthylphosphat und DCC

verlief mit ca. 90% Ausbeute. Unter den gleichen Reaktionsbedingungen wurde aber bei der 5'-Phosphorylierung des Trimeren selbst mit einem großen Überschuß an β -Cyanoäthylphosphat kein Umsatz über 40% erzielt. Die Verwendung von Triisopropylbenzolsulfonylchlorid (TPS) als Kondensationsmittel, das bei einer von HOLY⁷⁵ beschriebenen 5'-Phosphorylierung von Ribo-dinucleosidmonophosphaten bei allerdings langen Reaktionszeiten (16 h) gute Ausbeuten lieferte, war bei der Phosphorylierung des Trimeren nur geringfügig wirkungsvoller (40 bzw. 47% Umsatz) als der Einsatz von DCC.

Zufriedenstellende Ausbeuten zwischen 70 und 80% konnten dagegen mit dem Kondensationsmittel Mesitylensulfonylchlorid (MS) schon mit einem 5fachen Überschuß an β -Cyanoäthylphosphat erreicht werden (siehe Tab.10 S.58).

Die Auftrennung der Phosphorylierungsansätze erfolgte mit Hilfe der Ionenaustauschchromatografie an DEAE-Cellulose-Säulen, wie in Abb.17 gezeigt wird.

Abb.17 : Auftrennung eines Phosphorylierungsansatzes von HO-TpdG^{ibu}pdG^{ibu}_{Ac} mit β -CEP an DEAE-Cellulose



I : Pyridin

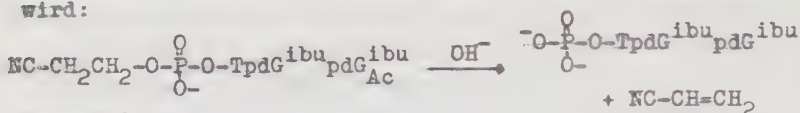
II : Mesitylensulfonsäure

III : TpdG^{ibu}pdG^{ibu}_{Ac} (20 OD₂₆₀)

IV : CEP TpdG^{ibu}pdG^{ibu}_{Ac} (36 OD₂₆₀)

V : nicht identifiziert,
nucleotidisches Spektrum
($\lambda_{\max}$ = 258 nm)

Wegen der geringen Ladungsdifferenz (eine negative Ladung) gelang keine sehr scharfe Trennung zwischen nicht-phosphoryliertem und phosphoryliertem Oligonucleotid. Eine bessere Trennung ließ sich erzielen, wenn vorher eine Partialhydrolyse durchgeführt wurde, um die Phosphatschutzgruppe abzuspalten, wie in Schema 9 gezeigt wird:



Schema 9

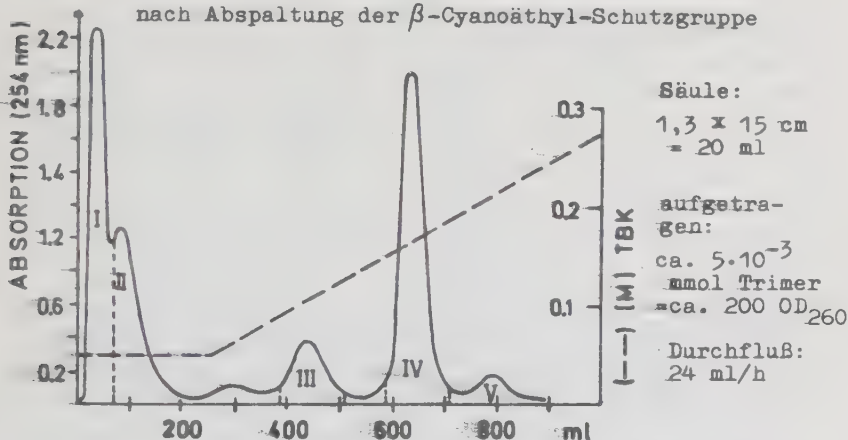
Die zur Abspaltung benötigten Hydrolysezeiten (mit 1 M NaOH bei 0°C) werden in der Literatur unterschiedlich von 5⁷⁶ bis 25 min⁶⁴ angegeben. Bei der Hydrolyse von 5'-MMTrT-p(CE) wurde von uns eine Zeit von 7 min als ausreichend für eine vollständige Abspaltung der β-Cyano-äthylgruppe ermittelt. Diese Hydrolysezeit entspricht derjenigen, die bei der Partialhydrolyse von 3'-Acetyl- und 3'-Isobutyryl-Schutzgruppen notwendig ist, und sollte somit eine Abspaltung der Basenschutzgruppen vermeiden. Unter diesen Hydrolysebedingungen konnte die Phosphatschutzgruppe des phosphorylierten Trimeren zumeist quantitativ oder zumindest zu ca. 90% abgespalten werden.

Zur weiteren Verbesserung der Trennung auf DEAE-Cellulose wurde nach Abbruch der Phosphorylierungsreaktion mehrfach mit Essigester extrahiert, wodurch ein großer Teil der entstandenen Mesitylensäure und stark violett gefärbter Nebenprodukte entfernt wurde, so daß ein reineres Gemisch auf die Säule gegeben werden konnte. Die DEAE-Cellulose Trennung eines auf diese Weise aufgearbeiteten Phosphorylierungsansatzes wird in Abb.18 gezeigt (s. Seite 57).

Eine von NARANG et al.³⁸ beschriebene 5'-Phosphorylierung von 5'-HO-Oligonucleotid-Triestern mit β-Cyano-äthylphosphat und Benzolsulfonyltriazolid(BST) gelang uns auch bei dem trimeren Diester. Unter Aktivierung

mit Mesitylensulfonyltriazolid und mit längeren Reaktionszeiten wurde das Trimere $5'\text{-HO-TpdG}^{\text{ibu}}\text{pdG}^{\text{ibu}}_{\text{Ac}}$ zu 80% phosphoryliert. Die verschiedenen Phosphorylierungsansätze sind in Tab.10 (Seite 58) zusammengefaßt.

Abb.18: DEAE-Trennung eines Phosphorylierungsansatzes nach Abspaltung der β -Cyanoäthyl-Schutzgruppe



- | | |
|--|---|
| I : Pyridin | IV: $\text{pTpdG}^{\text{ibu}}\text{pdG}^{\text{ibu}}$ (119 OD_{260}) |
| II : MS-Säure | V: vergl. Peak V in Abb.17 (S.55) |
| III: $\text{TpdG}^{\text{ibu}}\text{pdG}^{\text{ibu}}$ (29 OD_{260}) | |

Wie aus Tab.10 zu entnehmen ist, führt man die Phosphorylierung mit β -CEP am geeignetsten mit MS oder MST als Aktivierungsmittel durch, wobei letzteres vorzuziehen ist, da es ein saubereres Produktgemisch liefert. Der hohe Überschuß an Phosphorylierungsreagens und Kondensationsmittel kann vor der DEAE-Trennung durch eine Gelfiltration an Bio-Gel P-2 oder Sephadex G-15 leicht abgetrennt werden. Zur eigentlichen Trennung wird dann weniger DEAE-Cellulose Säulenmaterial benötigt, wodurch auch weniger nucleotidisches Material unspezifisch in der Säule gebunden wird (vergl. dazu S.48).

Nach der Isolierung des phosphorylierten Trimeren mußte die $3'$ -Hydroxylgruppe wieder geschützt werden, da ja bei der Abspaltung der Phosphatschutzgruppe mit NaOH

auch die 3'-Acetyl-Schutzgruppe abgespalten wird (vergl. Schema 9 S.56). Die Blockierung dieser 3'-terminalen Hydroxylgruppe erfolgte ebenfalls wieder durch Acetylierung, die in Abschnitt 5.1. S.52 beschrieben ist.

Tab.10 : Phosphorylierung von $\text{HO-TpdG}^{\text{ibu}}\text{pdG}_{\text{Ac}}^{\text{ibu}}$
mit β -Cyanoäthylphosphat

Trimeres (mmol. $\cdot 10^{-3}$)	Überschuß an β -CEP	Konden- sations- mittel	Überschuß pro β -CEP	Zeit (h)	Um- satz+) (%)
1,2	3	DCC	3,3	100	40
1,2	10	TPS	3	6	47
3	3	MS	2,5	2,5	64
10	5	MS	2	2,5	80
12	9	MS	3	2,5	75
8	50	MST	2	20	80

+) Der Umsatz wurde aus dem Mengenverhältnis phosphoryliertem zu nichtphosphoryliertem Trimeren nach der DEAE-Cellulose Trennung bestimmt.

5.5. 5'-Phosphorylierung mit POCl_3

Bei dieser Phosphorylierungsmethode nach KÖSTER^{71/72} wird das 5'-HO-Oligonucleotid mit POCl_3 direkt zu dem entsprechenden 5'-Phosphat umgesetzt, ohne daß eine Phosphatschutzgruppe benötigt wird, die nach erfolgter Reaktion wieder abgespalten werden muß. Diese Reaktion ist in Schema 10 dargestellt:



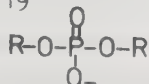
Schema 10

(R= $\text{TpdG}^{\text{ibu}}\text{pdG}_{\text{Ac}}^{\text{ibu}}$ z.B.)

Um die Bildung von Neben- und Zersetzungsprodukten zu unterdrücken, wird die Reaktion in heterogener Phase (Zusatz von unpolaren organ. Lösungsmitteln) durchgeführt, wodurch das Oligonucleotid nur kurzzeitig dem sehr reaktiven Phosphorylchlorid ausgesetzt sein soll. Eine bevorzugte Nebenreaktion, die durch Reaktion

eines weiteren Chloratoms des Phosphorylchlorids mit dem Oligonucleotid zu einem zweifach substituierten Phosphat, wie es in Abb.19 gezeigt ist, führt, soll durch den Zusatz der Base 2,6 Lutidin unterdrückt werden.

Abb.19



R=Oligonucleotid

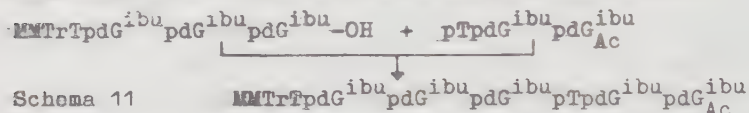
Dieses sterisch gehinderte Amin deaktiviert das zweite und dritte Chloratom des POCl_3 . Die Oligonucleotide werden gleichfalls als Lutidiniumsalze eingesetzt.

Nach diesem Verfahren wurde von uns das Trimere $\text{TpdG}^{\text{ibu}}\text{pdG}_{\text{Ac}}^{\text{ibu}}$ in einer Äther/Petroläther-Mischung (2:1) suspendiert und mit POCl_3 umgesetzt. Die Ausbeute lag mit 54% in dem von KÖSTER angegebenen Bereich. Die Auftrennung der Produkte auf DEAE-Cellulose lieferte außer dem nichtphosphorylierten und dem phosphorylierten Oligonucleotid ein Nebenprodukt, das erst mit höherer Ionenstärke eluiert wurde; das Elutionsprofil war ähnlich wie bei der Auftrennung der Phosphorylierung mit β -CEP (vergl. Abb.18 S.57). Ein Dünnschichtchromatogramm der Produkte (nach Abspaltung aller Schutzgruppen) auf PEI-Cellulose zeigte, daß das Nebenprodukt mehr negative Ladungen besitzt als das Hauptprodukt. Es dürfte sich dabei um ein der Abb.19 entsprechendes Produkt mit $\text{R} = \text{TpdG}^{\text{ibu}}\text{pdG}_{\text{Ac}}^{\text{ibu}}$ handeln, das trotz der Gegenwart von 2,6 Lutidin entstanden ist.

Auch wenn diese direkte Phosphorylierung mit geringeren Ausbeuten verläuft und die Bildung einiger (aber abtrennbarer) Nebenprodukte nicht ganz verhindert werden kann, erscheint sie zweckmäßiger als die Phosphorylierung mit β -Cyanoäthylphosphat, da sie weniger Schutzgruppenreaktionen und damit verbundenen Arbeits- und Zeitaufwand erforderlich macht.

6. Versuche zur Synthese eines heptameren Oligonucleotids durch Blockkondensation

Ziel dieses Arbeitsabschnittes war die Verknüpfung zweier in einem Cooligokondensationsverfahren dargestellter Oligonucleotide, des Tetrameren und des 5'-phosphorylierten Trimeren, zu einem Heptanucleotid:



Solche Blockkondensationen nach der Diestermethode verliefen bei allen Arbeitsgruppen nur mit geringen Ausbeuten und unter der Bildung von Nebenprodukten. Erst seit kurzem kennt man die dabei ablaufenden Reaktionen genauer, die im folgenden umrissen werden, da sie zum Verständnis der Diestermethode von größter Bedeutung sind.

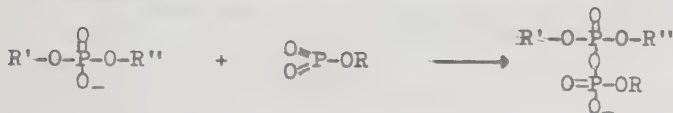
6.1. Reaktionsmechanismen bei der Kondensation von Diester-(Oligo)nucleotiden und deren Konsequenzen für die Synthese

KNORRE u. Mitarb.^{77,78} untersuchten mit Hilfe der ³¹P-NMR Spektroskopie den Verlauf einer Kondensation und gaben eine Zuordnung der auftretenden Signale zu möglichen Zwischen-, Neben- und Endprodukten an. Sie schlossen daraus, daß die Aktivierung der 5'-Phosphatkomponente durch das Kondensationsmittel TPS zu einem Derivat führt, das sie als Nucleosid-metaphosphat bzw. dessen Pyridiniumkomplex deuteten (Abb.20):



Dieses stark elektrophile Zwischenprodukt reagiert leicht mit nucleophilen Zentren wie der freien 3'-OH-Gruppe eines (Oligo)nucleotides oder den internucleotidischen

Phosphodiesterbindungen eines Oligonucleotides. Bedingt durch den stärker nucleophilen Charakter der Phosphodiesterbindung wird jedoch bevorzugt ein trisubstituiertes Pyrophosphat (Schema 12) gebildet anstelle der eigentlich gewünschten neuen Internucleotidbindung.



R , R' , R'' =

Nucleosid- oder Oligonucleotidrest

Schema 12

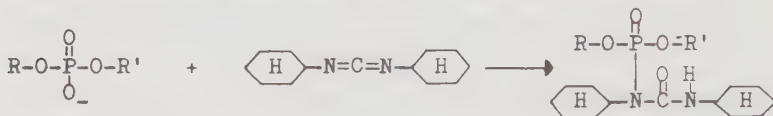
Dieses trisubstituierte Pyrophosphat hat nur geringe Neigung mit der 3'-OH-Gruppe der Nucleosidkomponente zur gewünschten internucleotidischen Phosphodiesterbindung abzureagieren. Zu dieser Phosphorylierungsreaktion steht also nur noch derjenige Anteil des aktivierten Derivates (vergl. Abb.20 S.60) zur Verfügung, der nicht als trisubstituiertes Pyrophosphat blockiert ist.

Neben diesen Reaktionen laufen noch weitere Nebenreaktionen ab, die ebenfalls zu einem Verbrauch der aktivierten Nucleotidkomponente führen.

Um trotz dieser Nebenreaktionen noch befriedigende Ausbeuten bei der Blockkondensation zu erreichen, fordert KNOPPE einen mindestens n+2 fachen Überschuß an 5'-Phosphatkomponente bezogen auf n Phosphodiesterbindungen in der 3'-OH-Komponente. Als beste Lösung schlägt er die (reversible) Blockierung der Phosphodiesterbindungen im 3'-OH-Block vor. Diese kann einerseits durch Überführung in ein Triesterderivat erfolgen, womit die Synthesestrategie dem in Abschnitt 7 beschriebenen Triesterverfahren ähnlich wird. Alternativ schlägt er vor, die Internucleotidbindungen nur während der Kondensation reversibel zu blockieren. Diese beiden Möglichkeiten zur Blockierung der Phosphodiesterbindungen wurden daher von uns zur Erleichterung der Blockkondensation geprüft.

6.2. Versuche zur Blockierung der Phosphodiesterbindungen von Oligonucleotiden

Die reversible Blockierung der Phosphodiesterbindung wird nach KNORRE u. ZARYTOVA⁷⁸ durch die Umsetzung des Oligonucleotids mit DCC zum Dicyclohexyl-Harnstoff-Derivat erreicht, wie in Schema 13 verdeutlicht wird.



Schema 13

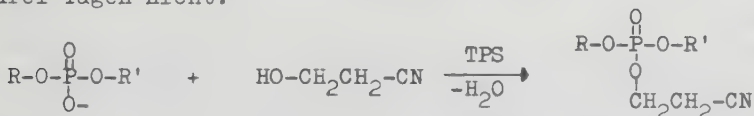
R, R' = Nucleosid- oder Oligonucleotidrest

Dieses Produkt soll während der Kondensationsreaktion stabil bleiben, mit Pyridin/H₂O aber wieder leicht gespalten werden. Unsere Versuche, ein Gemisch der Cooligomeren MMTrT(pdG^{ibu})_n (n > 1) mit DCC in Pyridin unter absolut wasserfreien Bedingungen in die neutralen Harnstoffderivate zu überführen, zeigten keinen Erfolg. Die Kieselgel-Dünnschichtchromatografie in wasserfreien organischen Laufmitteln erbrachte keinen Hinweis auf ungeladene Oligonucleotide. Entweder sind spezielle Reaktionsbedingungen erforderlich, die in der Veröffentlichung nicht erwähnt werden, oder die Umsetzung wird auch durch die Art der Nucleobasen im Oligonucleotid beeinflusst (KNORRE setzte nur dT-Oligomere um). Es wäre denkbar, daß dG- haltige Oligonucleotide, die schlechte Ausbeuten bei der Knüpfung einer Phosphodiesterbindung liefern, auch mit DCC nurin geringem Maß zum Harnstoffderivat reagieren.

Eine andere Möglichkeit, die Phosphodiesterbindungen eines Oligonucleotides zu blockieren, bietet die Veresterung mit einem geeigneten Alkohol zu einem Triesterderivat. So werden von SMRT⁷⁹ die Veresterung eines Ribodinucleosid-monophosphates mit Hydroxypropionitril und von MILLER u. Mitarb.^{80,81} die Überführung von Oligonucleotiden in Äthyl- bzw. Methyl-Triesterderivate beschrieben. Diese Veresterungen verliefen aber keineswegs

quantitativ. Für unsere Zwecke kann nur mit Hydroxypropionitril verestert werden, da die Abspaltungsbedingungen für Äthyl- und Methylschutzgruppen für die Polynucleotidsynthese ungeeignet sind.

Die Überführung des Cooligomerengemisches $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n$ (mit $n > 1$) in die Triesterderivate durch Umsetzung mit 2-Hydroxy-propionitril unter Aktivierung mit TPS gemäß Schema 14 gelang auch bei Reaktionszeiten bis zu drei Tagen nicht.



Schema 14 R, R' = Nucleosid- oder Oligonucleotidrest

Dünnschichtchromatografisch konnte kein Unterschied gegenüber den Ausgangsprodukten beobachtet werden.

Zu einer deutlichen Umsatzsteigerung bei der Blockkondensation sollte die 3'-Hydroxylkomponente aber zumindest weitgehend in ein Triesterderivat zu überführen sein.

Alle diese Experimente zeigen, daß es (noch) kein Verfahren gibt, oligomere Diester in guten Ausbeuten in geeignete Triesterderivate zu überführen. Diese Ergebnisse wurden mittlerweile auch von KNORRE⁸² bestätigt, der in der Bildung von inter- und intramolekularen Pyrophosphaten insbesondere mit wachsender Kettenlänge die Ursache für die schlechte Reaktion der Phosphodiestergruppen mit einer Hydroxylkomponente zum Triester sieht.

Die vorgesehene Blockkondensation mußte also nach der Diestermethode durchgeführt werden, wie in den nächsten Abschnitten beschrieben wird.

6.3. Versuche zur Blockkondensation

Bei den im folgenden beschriebenen Blockkondensationsversuchen wurden als 3'-OH-Komponente ein Trimeres und ein Tetrameres eingesetzt, die aus den Cooligokondensa-

tionen gewonnen worden waren. Als 5'-Phosphatkomponente wurde ein Trimeres, das zunächst mit β -Cyanoäthylphosphat phosphoryliert wurde (siehe Abschnitt 5.4.), eingesetzt. Die Verknüpfung der beiden Komponenten sollte gemäß Schema 11 (Seite 60) erfolgen, nur daß als 3'-OH-Komponente in einigen Versuchen auch das Trimer $\text{LMTrTpdG}^{\text{ibu}}\text{pdG}^{\text{ibu}}\text{-OH}$ eingesetzt wurde, und somit als Produkt das Hexamere $\text{MMTrTpdG}^{\text{ibu}}\text{pdG}^{\text{ibu}}\text{pTpdG}^{\text{ibu}}\text{pdG}^{\text{ibu}}_{\text{Ac}}$ entstehen sollte.

Ein Teil der Versuche wurde noch vor Veröffentlichung der Arbeiten von KNORRE u. Mitarb.⁷⁸ durchgeführt und berücksichtigte so hinsichtlich der Reaktionsparameter deren Ergebnisse nicht.

6.3.1. Blockkondensationen mit dem Kondensationsmittel Mesitylensulfonylchlorid (MS)

Eine erste Kondensation von Trimer + Trimer wurde mit einem zweifachen Überschuß an 5'-Phosphatkomponente und einem vierfachen an MS (bezogen auf die 3'-OH-Komponente) durchgeführt. Die DEAE-Cellulose-Trennung dieses Ansatzes zeigte außer dem trimeren Ausgangsprodukt kein Oligomeres, bei dem die MMTr-Schutzgruppe durch Anfärben mit Perchlorsäure ^{+) nachgewiesen werden konnte.}

Eine zweite Kondensation mit dreifachem Überschuß an Phosphatkomponente lieferte auch kein Hexameres. Das gleiche negative Ergebnis zeigte eine Kondensation mit einem Überschuß an 3'-OH-Komponente.

Es wurde daher versucht, ob sich mit einem anderen Kondensationsmittel, bessere Ergebnisse erzielen lassen.

+) Durch Ansprühen der Dünnschichtchromatogramme mit 10% HClO_4 und nachfolgendem Erwärmen werden Flecke MMTr-geschützter Oligonucleotide durch Gelbfärbung (bedingt durch die Bildung des MMTr^+ -Kations) identifiziert.

6.3.2. Blockkondensationsversuche mit dem Kondensationsmittel Mesitylensulfonyltetrazolid (MSTe)

In der Triesterchemie erhöht die Verwendung von Arylsulfonyltetrazoliden⁸³ (siehe 7.3.1. S.79) als Kondensationsmittel vor allem bei Blockkondensationen die Ausbeuten beträchtlich. Insbesondere die Verknüpfung dG-enthaltender Oligonucleotide, die auch mit der Triester-methode in geringeren Ausbeuten verläuft, soll durch den Einsatz von Arylsulfonyltetrazoliden erleichtert werden.

Da diese neue Klasse von Kondensationsmitteln bisher nur in der Triestervariante eingesetzt worden war, mußte erst ein Test mit Bausteinen aus dem Diesterverfahren zeigen, ob diese Kondensationsmittel auch hierfür geeignet sind. Dazu wurden äquimolekulare Mengen von MMTrT und $\text{pdG}_{\text{Ibu}}^{\text{ibu}}$ mit einem dreifachen Überschuß an Mesitylensulfonyltetrazolid (MSTe, Darstellung siehe Seite 79) kondensiert und die Bildung des Dinucleosid-monophosphates in Abhängigkeit von der Zeit gemessen (Einzelheiten im experiment. Teil). Die Zeit-Umsatz Kurve in Abb.21 zeigt, daß nach ca.15 h eine Ausbeute von 75-80% erreicht worden war.

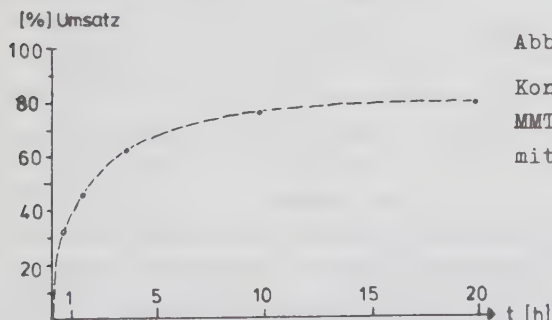


Abb. 21 :
Kondensation von
MMTrT u. $\text{pdG}_{\text{Ibu}}^{\text{ibu}}$
mit MSTe

Dies ist eine höhere Ausbeute als sie mit Arylsulfonylchloriden bei äquimolekularen Mengen an 3'-OH- und 5'-Phosphatkomponente erreicht wird. Zwar ist eine Reaktionszeit von ca. 15 h notwendig, trotzdem werden, wie das dünnschichtchromatografische Bild zeigt, offenbar

weniger Nebenprodukte gebildet als z.B. bei der Verwendung von MS. Ähnlich gute Ausbeuten wurden von H.GÖRTZ⁸⁴ bei der Kondensation von 5'-geschütztem Thymidin mit N,3'-geschütztem Desoxy-adenosin-5'-phosphat mit MSTe erzielt. Es war daher zu hoffen, daß die Diester-Blockkondensationen mit diesem neuen Kondensationsmittel ebenfalls erfolgreicher verlaufen würden als mit MS.

Als erster Test wurden äquimolekulare Mengen an 3'-OH-Trimeren und 5'-Phosphat-Trimeren mit einem 10 fachen Überschuß an MSTe kondensiert. Auf einem Dünnschichtchromatogramm konnte durch Ansprühen mit 10% HClO₄ außer dem Trimeren jedoch kein anderes Oligomeres mit MMTr-Gruppen nachgewiesen werden. Auch eine Kondensation, bei der ein vierfacher Überschuß an Phosphatkomponente und ein 30facher an MSTe eingesetzt wurde, brachte kein anderes Ergebnis.

Zur Darstellung des Heptameren wurde das 3'-OH-Tetramere mit einem vierfachen Überschuß an phosphoryliertem Trimeren und einem 30fachen an MSTe 22 h kondensiert. Der Ansatz wurde wie üblich aufgearbeitet und dann über eine Tritylcellulose-Säule getrennt. Der affine Anteil, der mit 70% Äthanol/0,2 M TBK von der Säule gewaschen wurde, zeigte ein Extinktionsverhältnis 260nm/472nm = 1,04, das genau dem des Tetrameren (vergl. Tab.5 S.32) entspricht. Auf einem Kieselgel-Dünnschichtchromatogramm in CHCl₃ / MeOH (1:2) wurde in der affinen Fraktion nur das Tetramere gefunden, während in der nichtaffinen Fraktion keine Oligomere mit MMTr-Gruppe vorhanden waren.

Bei keinem der Blockkondensationsansätze konnten die erhofften Produkte erhalten werden. Da die bei diesen Ansätzen verwendeten Reaktionsbedingungen bei den Cooligokondensationen und den schrittweisen Synthesen zu normalen Ergebnissen geführt hatten, könnte das unbefriedigende Ergebnis der Blockkondensationsversuche durch einen bisher noch nicht berücksichtigten Strukturparameter bedingt sein. Zur Prüfung dieser Möglichkeit wurden die in Abschnitt 6.4. beschriebenen Untersuchungen durchgeführt.

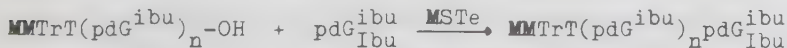
6.4. Test der Baublöcke auf Zugänglichkeit der 3'-OH- bzw. der 5'-Phosphatgruppe

Die Ursache dafür, daß einer oder mehrere der Baublöcke bei den Blockkondensationen nicht reagierte, konnte an an der fehlenden Zugänglichkeit einer der beiden funktionellen Gruppen liegen, die zur Phosphodiesterbindung reagieren sollen. Denn eine Fehlverknüpfung oder Fehlsequenz innerhalb eines Baublockes konnte auf Grund der Analysenergebnisse (UV, chromatografisches Verhalten, Enzymspaltung) ausgeschlossen werden.

Es mußte daher getestet werden, ob die 3'-OH-Gruppe des einen Blocks (sowohl Trimer als auch Tetramer) wirklich ungeschützt vorliegt, und ob die 5'-Phosphatgruppe des anderen Blocks von der β -Cyanoäthylschutzgruppe befreit ist. Dazu wurden die folgenden Modellversuche ausgeführt.

6.4.1. Test der 3'-OH-Blöcke auf Zugänglichkeit der 3'-OH-Gruppe

Chromatografisch läßt sich nicht eindeutig feststellen, ob die 3'-Hydroxylgruppe ungeschützt oder blockiert ist. Die Entscheidung dieser Frage konnte somit nur durch die Kondensation mit einem Nucleotid zu einem Oligomeren der Kettenlänge $n+1$ ermöglicht werden (Schema 15).



Schema 15

Eine Probe des Trimerenblocks $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_2\text{-OH}$ konnte mit einem zehnfachen Überschuß an $\text{pdG}^{\text{ibu}}_{\text{Ibu}}$ zu ca. 40% zum Tetrameren umgesetzt werden (Das Produkt wurde auf DEAE-Cellulose getrennt und die Kettenlänge durch das Verhältnis E_{260}/E_{472} geprüft). Diese Ausbeute zeigt, daß zumindest der überwiegende Teil der 3'-OH-Gruppen ungeschützt vorliegen muß, da die Ausbeute der von KHORANA et al.⁸⁵ für die schrittweise Synthese berichteten nahe kommt.

Die Kondensation des Tetrameren $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_3\text{-OH}$ mit einem zehnfachen Überschuß an $\text{pdG}^{\text{ibu}}_{\text{Ibu}}$ ergab ebenfalls das nächstlängere Oligomere mit einer Ausbeute von ca. 20% .

Durch diese Versuche wurde also die Zugänglichkeit der 3'-Hydroxylgruppen eindeutig nachgewiesen; somit konnte für das Ausbleiben der Blockkondensation nur noch die 5'-Phosphatkomponente verantwortlich sein, die daraufhin ebenfalls in Modellreaktionen eingesetzt wurde.

6.4.2. Test des 5'-Phosphatblocks $\text{pTpdG}^{\text{ibu}}_{\text{Ac}}\text{pdG}^{\text{ibu}}_{\text{Ac}}$

Als einfacher Test zur Prüfung, ob die 5'-Phosphatkomponente mit der 3'-Hydroxylgruppe einer Nucleosidkomponente eine Phosphodiesterbindung eingeht, wurden Kondensationen mit dem Nucleosid 5'-MMTrT-OH durchgeführt. Dabei sollte sich ein Tetrameres mit einer 5'-MMTr-Endgruppe bilden, das sich auf einem Kieselgel-DC in Essigester als Fleck mit kleinem R_f -Wert, der bei Säurebehandlung gelb gefärbt wird, identifizieren lassen sollte.

Trotz mehrerer Kondensationsversuche sowohl mit Überschuß an MMTrT (1,5- u. 3fach) als auch mit phosphoryliertem Block im Überschuß (2- u. 3fach), entweder mit MS oder MSt als Kondensationsmittel (10facher Überschuß bezogen auf die Phosphatkomponente), konnte bei keinem Ansatz das erhoffte tetramere Produkt nachgewiesen werden.

Um zu gewährleisten, daß bei dem 5'-Phosphatblock die β -Cyanoäthyl-Schutzgruppe wirklich quantitativ abgespalten ist, wurde ein Phosphorylierungsansatz mit β -CEP nach Abbruch der Reaktion 25 min alkalisch hydrolysiert und anschließend wieder acetyliert (vergl. Abschnitt 5.4.). Aber auch mit diesem Oligomeren konnte keine Kondensation mit MMTrT zum Tetrameren beobachtet werden.

Da der Phosphatblock nach Abspaltung aller Schutzgruppen durch Enzymspaltung mit Schlangengift-Phosphodiesterase (vergl. 4.4. S.50) eindeutig als 5'-phosphoryliertes Trimeres charakterisiert werden konnte (gef.: pT:pdG = 1:2,8 , theor.: 1:3), bedeuten die oben beschriebenen

Kondensationsversuche, daß das bis auf die 5'-Phosphatgruppe voll geschützte Oligonucleotid $pTpdG^{ibu}pdG^{ibu}_{Ac}$ schon mit der 3'-OH-Funktion eines Nucleosids gar nicht oder nur mit extrem niedrigen Ausbeuten unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung reagiert. Es wird daher verständlich, weshalb bei den Blockkondensationsversuchen kein Produkt gefunden werden konnte.

Um dennoch geringe Mengen an eventuell entstandenen Reaktionsprodukten nachzuweisen, wurde ein Blockkondensationsansatz mit radioaktiv markierten Oligonucleotiden auf seine Produktzusammensetzung hin untersucht.

Da die Ausgangsprodukte aber bereits synthetisiert worden waren und keine Radioisotopen enthielten, mußte die Markierung durch einen 3H -Austausch nach der Blockkondensationsreaktion eingeführt werden. Zuvor wurden jedoch Testversuche mit einem Mononucleotid sowie dem Dimeren und Trimeren durchgeführt.

6.5. 3H -Austausch an pdG und $T(pdG)_n$

Bei Purinbasen läßt sich das C(8)-H-Atom (vergl. Abb.22) leicht gegen ein 3H -Atom durch Behandlung mit 3H_2O austauschen. Oligonucleotide, die unmarkierte Purinbasen

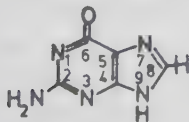


Abb.22

enthalten, lassen sich so auf einfache Weise mit einer radioaktiven Markierung versehen.

MILLER u. Mitarb.⁸⁰ z.B. verwendeten diesen 3H -Austausch für Oligonucleotide, die zu Gleich-

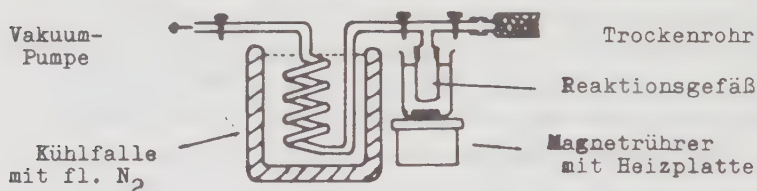
gewichtsdialysen an t-RNS eingesetzt wurden. Reaktionsbedingungen und Kinetik des 3H -Austausches wurden insbesondere von SHABAROVA u. Mitarb.⁸⁶ untersucht. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß der Austausch am schnellsten in alkalischer Lösung bei Temperaturen zwischen 60° und $90^{\circ}C$ verläuft.

Vor dem 3H -Austausch eines Blockkondensationsgemisches

wurden Versuche mit pdG, d-TpG und d-TpGpG durchgeführt, um festzustellen, wie hoch die spezifischen Aktivitäten sind, die sich unter den von uns verwendeten Reaktionsbedingungen erzielen lassen.

Zu den Austauschreaktionen wurde aus Sicherheitsgründen eine $^3\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ Mischung von schwacher spezifischer Aktivität eingesetzt (25 mCi/ml = 450 mCi/mol = $1,67 \cdot 10^{10} \text{ sec}^{-1} \text{ mol}^{-1}$). Unter Zugabe von 0,1 N NaOH wurde bei 60°C in einer Vakuumapparatur, die in einer luftdichten Kammer (glove box) untergebracht war, über einen Zeitraum von 3 h ausgetauscht (siehe Abb. 23).

Abb.23 : Anlage zum ^3H -Austausch in Oligonucleotiden



Nach der vollständigen Entfernung des $^3\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ durch zweimalige Lyophilisation wurden folgende Aktivitäten in den Proben gemessen (Tab.11):

Tab.11: Aktivitäten nach ^3H -Austausch

(Oligo-) Nucleotid	μmol	cpm	cpm/ μmol	cpm/ $\mu\text{mol G}$	cpm/OD (260)
pdG	1	107000	107000	+))	
d-TpG	0,23	6060	26400	26400	1145
d-TpGpG	0,32	16130	50400	25200	1340

+) gemessene Aktivität zu hoch, da wohl noch $^3\text{H}_2\text{O}$ in der Probe war bedingt durch eine unvollständige Lyophilisation

Die erzielten spezifischen Aktivitäten waren etwas geringer als diejenigen, die von SHABAROVA u. Mitarb.⁸⁶ allerdings mit $^3\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ höherer spezifischer Aktivität bei vergleichbaren Oligonucleotiden erreicht worden waren.

6.6. Blockkondensation von $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_3\text{-OH}$ mit $\text{pTpG}^{\text{ibu}}\text{pdG}^{\text{ibu}}_{\text{Ac}}$ und anschließender radioaktiver Markierung durch ^3H -Austausch

Der tetramere 3'-OH-Block wurde mit einem vierfachen Überschuß an 5'-Phosphatblock und einem 50fachen Überschuß an MSTe 12 h kondensiert. Nach Abbruch der Kondensation wurde mit Essigester extrahiert, dann wurden alle Schutzgruppen abgespalten (vergl. S.49) und der Ansatz über eine Bio-Gel P-2 Säule aufgereinigt. Die Fraktionen im Ausschlußvolumen der Säule wurden lyophilisiert und dann wie unter 6.5. beschrieben mit einer $^3\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ -Mischung radioaktiv markiert. Nach Reaktionsende wurde der Ansatz neutralisiert, lyophilisiert und dann über eine Bio-Gel P-30 Säule mit 0,2 M NH_4HCO_3 aufgetrennt. Bei der Gelfiltration an Bio-Gel P-30 sollte das Heptamere, falls es gebildet worden war, im Ausschlußvolumen der Säule eluiert werden, während die anderen Komponenten erst bei einem größeren Volumen eluiert werden sollten. Mit 1350 cpm/OD₂₆₀, die in den vereinigten Fraktionen des ersten Peaks gemessen wurden, wurde fast dieselbe spezifische Aktivität wie in den Testreaktionen erzielt (vergl. Tab.11 S.70). Das Dünnschichtchromatogramm auf PEI-Cellulose-Folie (siehe S.50) zeigte nur einen Fleck, der aber den gleichen R_f -Wert wie das Tetramere d-T(pG)₃ besaß und somit aus dem Tetrameren bestand.

In den Fraktionen des zweiten Peaks der Bio-Gel P-30 Trennung wurden ebenfalls Tetrameres und das phosphorylierte Trimere gefunden. Das Tetramere, das im Ausschlußvolumen der Säule eluiert worden war, lag wohl in Form von Assoziaten vor, ähnlich wie es bei der Papierchromatografie dieses Tetrameren der Fall war (vergl. S.50). Dies wurde durch das Elutionsverhalten einer anderen Probe des obigen Kondensationsansatzes bestätigt, die vor der Trennung auf Bio-Gel P-30 erhitzt wurde, um eventuelle Assoziate zu zerstören. Hier wurde im Ausschlußvolumen deutlich weniger Substanz eluiert, aber es konnte dennoch nur das

Tetramere gefunden werden.

Diese Versuche, bei denen die Nachweisgrenze für ein eventuell gebildetes Produkt durch den ^3H -Austausch stark herabgesetzt worden war, brachten auch keinen Hinweis auf die Bildung des gewünschten Heptameren. Hierauf wurden keine weiteren Kondensationsversuche auf Diesterbasis mehr durchgeführt.

7. Synthese des Heptameren d-TGGGTGG nach dem Triesterverfahren

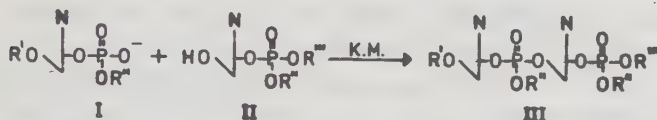
Da die bisherigen Versuche zur Darstellung des Heptameren d-TGGGTGG erfolglos verlaufen waren, wurde ein neuer Weg zur Synthese dieses Oligomeren eingeschlagen. Zum einen konnten somit die bei der Blockkondensation von Oligonucleotid-Diestern prinzipiell gegebenen Schwierigkeiten umgangen werden, zum anderen erschien es wichtig, dieses von anderen Arbeitsgruppen mit großem Erfolg angewendete Syntheseverfahren auch unserer Laborpraxis zugänglich zu machen.

In unserer Arbeitsgruppe waren zu Beginn dieser Versuche noch keine Erfahrungen mit der Triestermethode gesammelt worden. Jeder Reaktionsschritt mußte daher zunächst ausgearbeitet werden, wobei sich ergab, daß die Literaturvorschriften im allgemeinen einer Modifizierung bedurften.

7.1. Syntheseprinzip der Triestermethode

Der Aufbau eines Oligonucleotides (III) nach dem Triesterverfahren erfolgt durch die Verknüpfung einer Komponente mit 3'-terminaler Phosphodiestergruppe (I) mit einer Komponente, die eine freie 5'-OH-Gruppe besitzt (II); beide Komponenten liegen mit geschützter

Internucleotidbindung vor, falls es sich um Oligonucleotide handelt. Diese Verknüpfung liefert ein vollständig geschütztes, neutrales Triester-Oligonucleotid, wie in Schema 16 dargestellt wird:

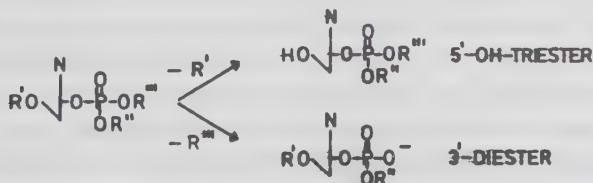


Schema 16 +) $\begin{array}{l} \text{R}'' = \text{Schutzgruppe} \\ \text{R}', \text{R}''' = \text{" " bzw.} \\ \text{(Oligo)nucleotidrest} \end{array}$ $\text{K.M.} = \text{Kondensationsmittel}$

Da eine Phosphodiestergruppe nur schlecht mit der Hydroxylgruppe eines sekundären Alkohols (wie z.B. der 3'-OH-Gruppe) reagiert, wird bei der Knüpfung einer Internucleotidbindung nach dem Triesterverfahren stets eine 3'-Phosphodiestergruppe mit einer 5'-OH-Gruppe verestert.

7.2. Synthese der monomeren Triester

Als Grundbausteine für diesen Syntheseweg werden vollgeschützte Nucleosid-3'-phosphorsäuretriestester benötigt, aus denen sich durch Abspaltung der 5'-OH-Schutzgruppe die Hydroxylkomponente oder durch Abspaltung einer Phosphatschutzgruppe die Komponente mit 3'-terminaler Phosphodiestergruppe freisetzen läßt (Schema 17).



Schema 17

Die unterschiedlichen Schutzgruppen müssen daher unabhängig voneinander abgespalten werden können.

+) Fußnote zu Schema 16 : Im folgenden wird die Komponente I oft als "Diester-Komponente" und II als "Hydroxyl-Komponente" bezeichnet.

Dabei wird die 5'-Hydroxylgruppe gewöhnlich durch die Monomethoxytrityl-(MMTr-) bzw. Dimethoxytrityl- (DMTr-) Schutzgruppe blockiert, die durch Säurebehandlung wieder abgespalten werden kann.

Als Phosphatschutzgruppen kommen meist die β,β,β Trichloräthyl- (ECKSTEIN⁸⁷), Phenyl- (REESE⁸⁸), o-Chlorphenyl- (v.BOOM et al.⁸⁹), und β -Cyanoäthyl-(LETSINGER³⁵) Gruppen zur Verwendung. Hiermit sind verschiedene Schutzgruppenkombinationen möglich, von denen einige in Tab.12 angegeben sind.

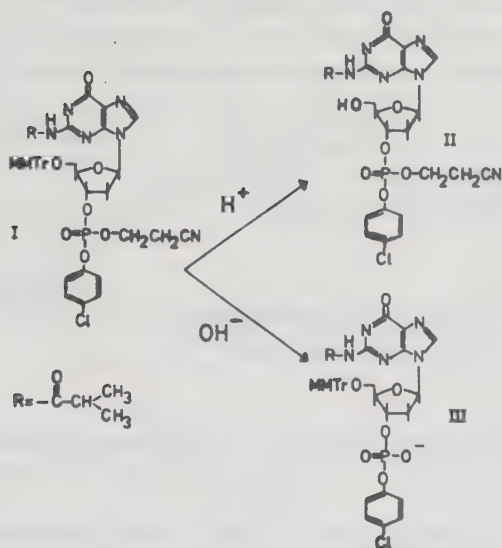
Tab.12 : Schutzgruppen des Triesterverfahrens
(vergl. Schema 17 S.73)

R'	R''	R'''	Literatur
MMTr- oder DMTr-	Trichloräthyl	β -Cyanoäthyl	CRAMER et al. ³⁶
	Phenyl	p-Nitrophenyl	REESE et al. ⁸⁹
	o-Chlorphenyl	Trichloräthyl	v.BOOM et al. ⁹⁰
	p-Chlorphenyl	β -Cyanoäthyl	NARANG et al. ³⁸

Wir haben uns für die Methode nach NARANG³⁸ mit der Kombination MMTr-, p-Chlorphenyl- und β -Cyanoäthyl-Schutzgruppe entschieden, da damit die besten Syntheserfolge erzielt worden sind und auch eine leichte, selektive Abspaltung der β -Cyanoäthylgruppe möglich ist.

Da in der zu synthetisierenden Sequenz nur die Nucleobasen T und G vorkommen, konnte als 5'-Hydroxyl-Schutzgruppe MMTr- eingesetzt werden. Normalerweise wird die DMTr-Schutzgruppe verwendet, die mildere Abspaltungsbedingungen benötigt und weniger die Gefahr einer Spaltung der N-glykosidischen Bindung zwischen Zuckerrest und Base mit sich bringt. Der erhöhten Labilität der DMTr-Gruppe kann durch geeignete Maßnahmen begegnet werden. Als Grundbaustein für dieses Triesterverfahren nach NARANG resultiert somit ein Monomeres, wie es am Beispiel des 5'-O-Monomethoxytrityl-N²-isobutyryl-desoxyguanosin-3'-p-chlorphenyl- β -cyanoäthyl-phosphat (I in Abb.24) gezeigt wird.

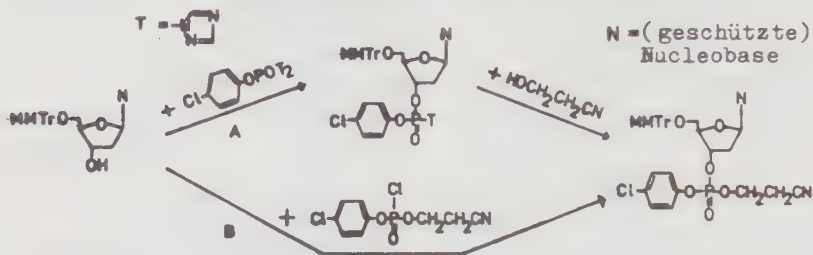
Abb.24 : Schutzgruppenabspaltungen am vollständig geschützten monomeren Triester-dG



Durch Säurebehandlung läßt sich der vollgeschützte Triester (I) in den Triester mit freier 5'-Hydroxylgruppe (II) = "Hydroxylkomponente" überführen, während durch alkal. Hydrolyse der 3'-Diester (III) = "Diesterkomponente" erhalten wird.

Die Synthese dieses vollgeschützten Triester-Bausteins kann ausgehend vom entsprechend (5'- u. basen-) geschützten Nucleosid auf zwei Arten erfolgen (siehe Schema 18 S.76). Entweder wird das Nucleosid mit dem bifunktionellen Phosphorylierungsmittel p-Chlorphenyl-phosphorsäureditriazolid zu einer Diesterzwischenstufe umgesetzt und dann mit Hydroxypropionitril zum Triester verestert (Variante A), oder das Nucleosid wird direkt mit dem monofunktionellen p-Chlorphenyl- β -cyanoäthyl-phosphorsäurechlorid zum geschützten Triester umgesetzt (Variante B). Beide Synthesewege wurden von uns untersucht, wobei sich zeigte, daß der zweistufige Weg nach NARANG³⁸ mehr

Nebenprodukte lieferte, und somit die Aufarbeitung schwieriger war als bei der direkten Synthese mit dem monofunktionellen Reagens; dieses Phosphorylierungsmittel wurde analog dem von v. BOOM u. Mitarb.⁹⁰ benutzten p-Chlorphenyl-trichloräthyl-phosphorsäuremonochlorid eingesetzt.



Schema 18

7.2.1. Synthese der 5'- (u. basen-) geschützten Nucleoside

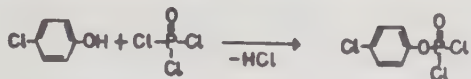
Das als Ausgangsprodukt benötigte 5'-MMTrT wurde nach SCHALLER u. Mitarb.⁹¹ dargestellt und über eine short-column-Kieselgelchromatografie⁹² gereinigt. Das zur Synthese des Nucleosids MMTrdG^{ibu} eingesetzte Zwischenprodukt dG^{ibu} wurde sowohl nach BÜCHI u. KHORANA⁹³ durch Umsetzung des ungeschützten Nucleosids mit iso-Buttersäureanhydrid in Pyridin als auch nach der Methode von NARANG³⁸ durch Reaktion mit Isobuttersäurechlorid in CHCl_3 dargestellt. Letztere Methode lieferte ein reineres Produkt, das aber vor der weiteren Umsetzung mit Monomethoxytritylchlorid in Modifizierung der Vorschrift durch Kieselgelchromatografie gereinigt werden mußte. Entsprechend der Vorschrift von NARANG erfolgte dann die Darstellung des MMTrdG^{ibu}.

7.2.2. Synthese des monofunktionellen Phosphorylierungsmittels

Zu dieser Synthese wird p-Chlorphenylphosphorsäuredichlorid benötigt, das nach CRAMER⁹⁴ durch Reaktion

von POCl_3 mit p-Chlorphenol dargestellt wurde (Abb.25):

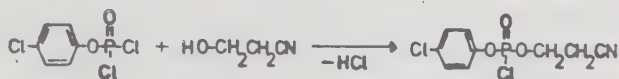
Abb.25



Wichtig für einen vollständigen Umsatz des p-Chlorphenols war die Zugabe einer katalytischen Menge an NaCl !

Nach der Destillation des Produktes wurde mit 3-Hydroxypropionitril analog einer Vorschrift von v. BOOM et al.⁹⁵ zum p-Chlorphenyl- β -cyanoäthyl-phosphorsäuremonochlorid umgesetzt (Abb.26):

Abb.26



7.2.3. Synthese der vollständig geschützten Triester-Monomere (vergl. I , Abb.24 S.76)

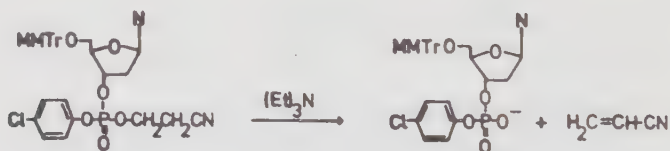
Die 5'-(u. basen-) geschützten Nucleoside wurden in CH_3CN mit einem 3-6fachen Überschuß an monofunktionellem Phosphorylierungsmittel unter Zusatz von N-Methylimidazol (zur Neutralisation des gebildeten HCl) umgesetzt (vergl. Schema 18 S.76 , Weg B). Nach der Extraktion des überschüssigen Phosphorylierungsmittels wurde der monomere Triester über eine Kieselgelsäule gereinigt, wobei auch nicht umgesetztes Nucleosid zurückgewonnen wurde. Die Ausbeuten an Triester lagen zwischen 70 und 90% , bei den dG-Triestern meist niedriger als bei den T-Triestern.

7.2.4. Abspaltung der 5'-MMTr-Schutzgruppe zur Darstellung der Hydroxylkomponente (II, Abb.24)

Die saure Abspaltung der 5'-MMTr-Gruppe erfolgte nach NARANG³⁸ mit einer 2%igen Benzolsulfonsäure(BSA)-Lösung in CHCl_3 (vergl. auch S.53 u. 74). Die Aufreinigung der 5'-Hydroxylkomponente wurde dann durch Kieselgelchromatografie erreicht, wobei Ausbeuten zwischen 80 und 90% erzielt wurden.

7.2.5. Abspaltung der β -Cyanoäthyl-Gruppe zur Darstellung der 3'-Diester-Komponente (II, Abb. 24)

Die alkalische Hydrolyse der β -Cyanoäthyl-Gruppe muß selektiv ohne Abspaltung der Basen-Schutzgruppe und der p-Chlorphenyl-Gruppe erfolgen, die ja zum Schutz der Internucleotidbindung benötigt wird. Mit NaOH-Lösung läßt sich diese Selektivität nur unter genau definierten Reaktionsbedingungen einhalten. Erst die Methode nach SOOD u. NARANG⁹⁶ brachte eine starke Vereinfachung in der selektiven Abspaltung der β -Cyanoäthyl-Gruppe; danach wird die β -Eliminierung der β -Cyanoäthylgruppe als Acrylnitril durch die Behandlung mit einem sehr großen Überschuß an Triäthylamin in Pyridin bewirkt (Schema 19).



Schema 19

Ein Angriff auf die ebenfalls alkali-labilen Basenschutzgruppen erfolgt unter diesen Bedingungen nicht, wie auch von uns nachgeprüft wurde. Der entstandene Diester kann nach dem Abziehen von Triäthylamin und Acrylnitril direkt zu einer Kondensationsreaktion eingesetzt werden. Auch auf längerkettige Oligonucleotidtriester, bei denen eine selektive Hydrolyse mit NaOH nicht mehr möglich ist, kann dieses Verfahren angewendet werden.

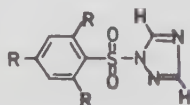
7.3. Reaktionsbedingungen zum Aufbau eines Oligonucleotid-Triesters

Ähnlich wie in der schrittweisen Diestermethode werden monomere Triester durch schrittweisen Anbau zu Baublöcken mit 3-6 Nucleotideinheiten verknüpft, aus denen durch Blockkondensationen Oligomere mit einer Kettenlänge

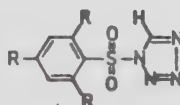
von 10 bis 20 synthetisiert werden. Die bei den einzelnen Reaktionsschritten wichtigen Punkte werden im folgenden erläutert.

7.3.1. Kondensationsmittel

Die Aktivierung der Diester-Komponente (I in Schema 16 S.73) erfordert wie in der Diestermethode nach KHORANA ein Kondensationsmittel, das hierbei stets ein Derivat einer Arylsulfonsäure ist, da das Kondensationsmittel DCC (siehe S.14) einen Diester nicht aktiviert. Eine Erhöhung der Ausbeuten an Internucleotidbindung vor allem bei der Verknüpfung von dG enthaltenden Triester-Oligomeren bringt die Verwendung von Arylsulfonyl-triazoliden⁹⁷ und -tetrazoliden⁸³ gegenüber dem Einsatz von Arylsulfonylchloriden :



Arylsulfonyl-triazolid

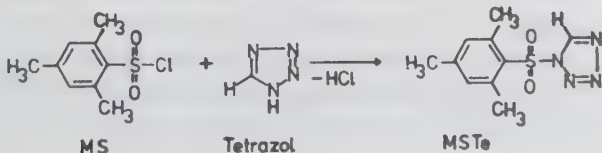


-tetrazolid

R= H	:	Benzolsulfonyl - (BST)	(BSTe)
R= CH ₃	:	Mesitylensulfonyl- (MST)	(MSTe)
R=CH(CH ₃) ₂	:	Triisopropylbenzolsulfonyl- (TPST)	(TPSTe)

Die Tetrazolide ergeben die höchsten Ausbeuten und wurden daher in dieser Arbeit eingesetzt. Die geringe Stabilität dieser Derivate verlangt aber ihre sofortige Verwendung nach der Synthese. Eine deutliche Ausbeuteverminderung wurde von uns bereits nach 5 tägiger Lagerung im Kühlschrank beobachtet.

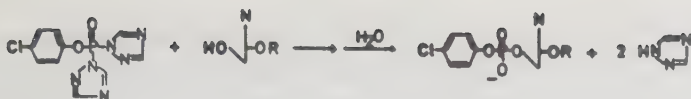
Wir setzten ausschließlich das Mesitylensulfonyl-tetrazolid ein, das aus MS und Tetrazol dargestellt wird:



Die Ausbeuten bei der Darstellung des MSTe lagen mit 50 - 60% etwas niedriger als sie von NARANG³⁸ angegeben wurden (70-80%). Durch ein NMR-Spektrum konnte die Struktur dieses Kondensationsmittels bestätigt werden.

7.3.2. Kondensationsbedingungen und Isolierung der Produkte

Obleich in der Triestervariante mit höheren Ausbeuten an Internucleotidbindung als in der Diestermethode gerechnet werden kann, lassen sich äquimolekulare Mengen an 3'-Diester- und 5'-Hydroxylkomponente nicht quantitativ verknüpfen, so daß im Reaktionsgemisch neben dem Produkt noch beide Ausgangsprodukte vorhanden sind. Ein zwei- bis dreifacher Überschuß einer Komponente, zweckmäßigerweise der 3'-Diesterkomponente, kann jedoch zu einem vollständigen Umsatz der anderen Komponente führen. Unter diesen Voraussetzungen können dimere und trimere Oligonucleotidtriester ohne zeitraubende Säulentrennungen durch einfache Produktausfällungen gewonnen werden (ITAKURA et al.⁹⁸). Erfolgt dagegen keine quantitative Umsetzung, was dann der Fall ist, wenn eine Komponente nicht im Überschuß zur Verfügung steht, oder wenn Oligonucleotidtriester in einer Blockkondensation verknüpft werden sollen, muß eine Abtrennung der nicht umgesetzten Ausgangsprodukte über eine Kieselgelsäulenchromatografie erfolgen. Eine Trennung zwischen Produkt (III) und der ebenfalls neutralen 5'-Hydroxylkomponente (II, vergl. Schema 16 S.73) ist dadurch aber meist nicht möglich. Läßt man dagegen die 5'-Hydroxylkomponente nach erfolgter Kondensationsreaktion mit einem geeigneten Phosphorylierungsmittel nachreagieren, so erhält sie eine negativ geladene Phosphodiestergruppe, wodurch eine Abtrennung vom ungeladenen Produkt ermöglicht wird. Eine quantitative und dabei schonende Phosphorylierung läßt sich mit p-Chlorphenyl-phosphorsäureditriazolid⁹⁹ (p-ClPhT₂) erreichen (Schema 20 S.81):



Schema 20

Mit den von NARANG⁹⁶ angegebenen äquimolekularen Mengen an p-Chlorphenyl-phosphorsäureditriazolid (bezogen auf die 5'-Hydroxylkomponente) und kurzen Reaktionszeiten von 10 min konnte in einigen Fällen (Blockkondensationen) keine quantitative Phosphorylierung erzielt werden. Wir setzten daher zur "Nachphosphorylierung" stets einen 1,5 bis 3fachen Überschuß an p-ClPhT₂ über einen Zeitraum von 30 bis 50 min ein, ohne dabei Nebenreaktionen zu beobachten.

Nach der Extraktion des Kondensationsmittels und des überschüssigen Phosphorylierungsmittels mit wässrigem Puffer kann das Produkt einfach von den jetzt beiden negativ geladenen Ausgangsprodukten abgetrennt werden.

7.3.3. Kieselgel-short-column-Chromatografie zur Auftrennung von Triester-Bausteinen

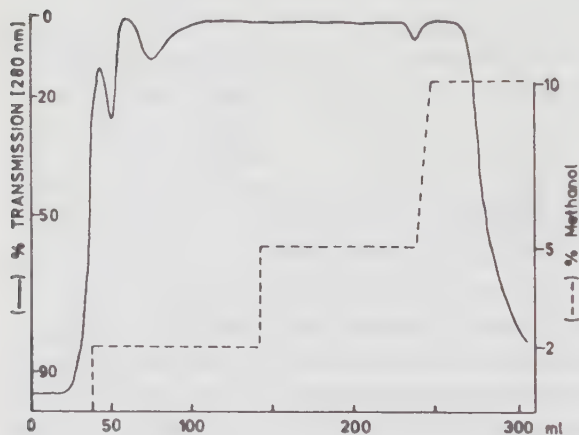
Vor diesen Untersuchungen zur Triestermethode wurden von uns zur Aufreinigung von geschützten Nucleosiden lange und großvolumige Säulen verwendet. Dabei traten aber häufig bedingt durch teilweise Abspaltung von Schutzgruppen Substanzverluste auf, außerdem war ein großer Zeit- und Lösungsmittelaufwand notwendig.

Diese ungünstigen Faktoren können durch die Verwendung kleinerer aber relativ dicker Säulen (Länge: $\varnothing = 5 - 2$) beträchtlich verkleinert werden. Diese von HUNT u. RIGBY⁹² vorgeschlagene "short column" -Technik soll keine Verluste an Trennkapazität und Trennschärfe bedingen, da hierbei mit einem feinkörnigeren Kieselgel als bei den großen Säulen gearbeitet werden kann.

Einige Arbeitsgruppen^{98,100} berichten, daß sie diese Technik zur Synthese von Oligonucleotidtriestern eingesetzt haben. Uns konnte aber das von HUNT u. RIGBY⁹² angegebene, Gips enthaltende Kieselgel G (für die Dünnschicht-

chromatografie) wegen seiner schlechten Laufeigenschaften und der unzureichenden Rückgewinnung des zu trennenden Materials (z.T. durch Abspaltung der β -Cyanoäthylgruppe verursacht) in keiner Weise überzeugen. Erst mit dem Einsatz der gipsfreien Kieselgelsorten Merck 7734 und Merck 7733 bzw. MN 81535 konnten wir diese Schwierigkeiten überwinden und ähnlich gute Trennungen wie auf Dünnschichtchromatogrammen erzielen (siehe Abb. 27).

Abb. 27 : Reinigung von $\text{MMTrdG}^{\text{ibu}}$ -Triester auf einer Kieselgel-short-column und Kieselgel-DC der eluierten Fraktionen.



Säule:

4 x 5 cm

Kieselgel:

Merck 7734

aufgetragen:

0,4 mmol

Elutionsgeschwindigkeit:

50 ml/h

eluiert:

$\text{MMTrTp dG}^{\text{ibu}}$

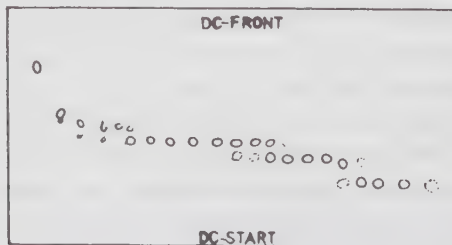
Triester =
0,17 mmol

und

$\text{MMTrTp dG}^{\text{ibu}}$
= 0,17 mmol

Laufmittel für
Kieselgel-DC:

CHCl_3 :MeOH=9:1



Das feinkörnigere Kieselgel Merck 7734 eignet sich wegen seiner hohen Kapazität vor allem für mittlere bis große Mengen an nucleotidischem Material (0,5–5 mmol mit Säule 8 x 4 cm); das Kieselgelvolumen muß der Menge an zu

trennender Substanz angepaßt werden. Kleinere Substanzmengen werden besser mit den etwas grobkörnigeren Kieselgelsorten Merck 7733 oder MN 81535 aufgetrennt. Die Elution der Substanzen erfolgte mit CHCl_3 (oder CH_2Cl_2) sowie einem Stufengradienten von MeOH und wurde dünn-schichtchromatografisch und teilweise mit einer UV-Durchflußmeßzelle verfolgt, wie in Abb.27 (S.82) am Beispiel einer Auftrennung von $\text{MMTrdG}^{\text{ibu}}$ -Triester dargestellt ist.

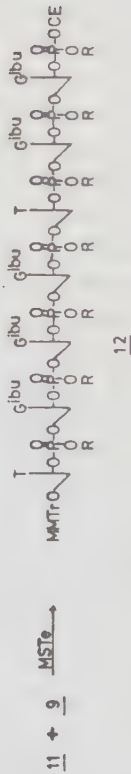
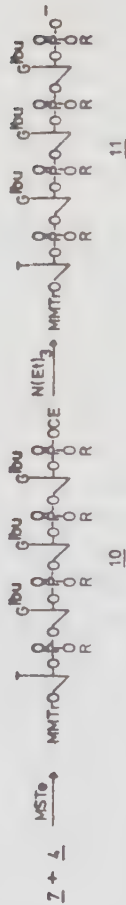
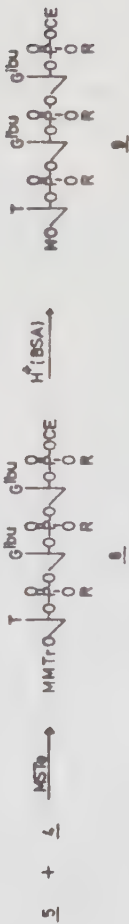
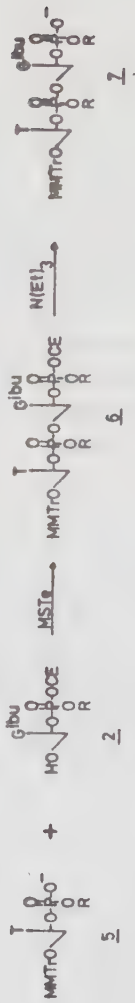
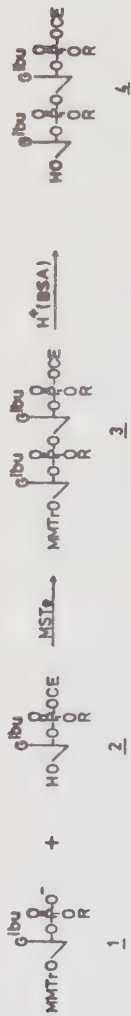
Eine wesentliche Zeitersparnis und Erhöhung der Trennleistung läßt sich mit der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatografie erzielen, wie Testversuche mit geschützten Nucleosiden und Nucleosid-phosphorsäuretriestern im analytischen bis halbpräparativen Maßstab zeigten. Bei Wahl des richtigen Laufmittels ließen sich die Aufreinigungen schnell und mit hoher Trennschärfe durchführen. Da uns eine solche Anlage erst gegen Ende der Arbeit zur Verfügung stand, mußten alle Trennungen, die zur Synthese des heptameren Oligonucleotidtriesters notwendig waren, mit der Kieselgel-short-column-Chromatografie ausgeführt werden. Wie eigene Versuche und Arbeiten anderer Arbeitsgruppen²⁷ inzwischen zeigten, ist eine Aufreinigung von Triesterbausteinen im g-Maßstab (5-20 mmol) mit einem präparativen HPLC-System in einem einzigen Trennschritt zu erzielen.

7.4. Synthese des Heptanucleotids d-TGGGTGG in der Triesterform

Nach der Prüfung und Ausarbeitung aller zu solch einer Synthese notwendigen Reaktionsschritte konnte mit der Synthese des Oligonucleotides nach der Triestermethode begonnen werden.

Bei der Aufstellung des Synthesepplans mußte berücksichtigt werden, daß das Heptamere am 3'-Ende phosphoryliert ist, damit es als 3'-Diesterkomponente in einer späteren Blockkondensation zum Aufbau eines Undecameren (vergl.S.8)

Abb.28 : Synthesepan des vollständig geschützten Heptanucleotidtriesters



eingesetzt werden kann. Daher wurde der in Abb.28 auf Seite 84 gezeigte Weg eingeschlagen.

Nach jedem Reaktionsschritt - in der Abbildung durch den Reaktionspfeil gekennzeichnet - erfolgte die Isolierung des Produktes durch Kieselgel-Säulenchromatografie. Eine Ausnahme bildete die Abspaltung der β -Cyanoäthylgruppe mit Triäthylamin (Et_3N), nach der keine Säulentrennung erforderlich war. Bei der Synthese der beiden Dimeren 3 und 6 konnte auf eine Nachphosphorylierung mit dem bifunktionellen Phosphorylierungsreagens p-ClPhT₂ (vergl. S.81) verzichtet werden, da eine säulenchromatografische Abtrennung des Produktes von der 5'-Hydroxylkomponente noch möglich war. Bei den anderen Kondensationsreaktionen mußte dagegen nachphosphoryliert werden, um eine einwandfreie Trennung zu gewährleisten.

Diese Trennungen wurden mit einem langsam ansteigenden Stufengradienten von MeOH (vergl. auch S.83) ausgeführt, wobei zu beobachten war, daß mit wachsender Kettenlänge auch eine höhere MeOH-Konzentration zur Elution benötigt wurde, selbst wenn der R_f -Wert auf Kieselgel-DC-Folien gleichblieb oder sogar größer wurde.

Nach der Säulenchromatografie wurden die Ausbeuten an Oligomeren durch die Aufnahme eines UV-Spektrums bestimmt; die Ergebnisse sind in Tab.13 aufgeführt.

Tab.13 : Ausbeuten bei d. Synthese d. Heptanucleotidtriesters

3'-Diester-Komponente (mmol)	5'-Hydroxyl-Komponente (mmol)	MSTe (mmol)	p-ClPhT ₂ (mmol)	Produkt (mmol)	Ausbeute (%)
Monomer <u>1</u> 1	Monomer <u>2</u> 0,65	2,5	-	Dimer <u>3</u> 0,32	49
Monomer <u>5</u> 1,2	Monomer <u>2</u> 0,5	3	-	Dimer <u>6</u> 0,42	84
Monomer <u>5</u> 0,1	Dimer <u>4</u> 0,08	0,3	0,2	Trimer <u>8</u> 0,045	56
Dimer <u>7</u> 0,077	Dimer <u>4</u> 0,075	0,3	0,4	Tetramer <u>10</u> 0,03	40
Tetramer <u>10</u> 0,027	Trimer <u>9</u> 0,026	0,13	0,15	Heptamer <u>12</u> 0,038	15

Die erzielten Ausbeuten lagen vor allem bei den Blockkondensationen deutlich unter dem aus dem Dünnschichtchromatogramm nach der Kondensation erwarteten Wert für den Umsatz an Ausgangsprodukt. Diese Verluste waren wohl auf eine unvollständige Elution der Produkte von der Kieselgelsäule zurückzuführen, da die Säulendimensionen für die eingesetzten Substanzmengen noch zu groß gewählt worden waren.

Die Reinheit der so gewonnenen Oligonucleotidtriestер wurde dünn-schichtchromatografisch und UV-spektroskopisch überprüft. Als Hinweis auf die Kettenlänge wurde hier das Verhältnis E_{280}/E_{472} herangezogen (vergl. auch S.31). Diese Daten der Oligonucleotidtriestер sind in Tab.14 zusammengefaßt:

Tab.14 : Charakterisierung der Oligonucleotidtriestер

Substanz Nr. von Abb.28	R _f -Werte ^{a)}		UV-Daten ^{b)}			
	Laufmittel E F		^{c)} $\lambda_{\max}$ (nm)	$\lambda_{\min}$ (nm)	E_{260}/E_{280} gef.	E_{280}/E_{472} gef. ber.
Monomer <u>2</u>	0,19	0,52	277 261 255	272 234	1,37	
Dimer <u>3</u>	0,24	0,65	276 s 260 254	232	1,32	0,48 0,42
Dimer <u>4</u>	0,15	0,45	277 s 262 255	233	1,38	
Dimer <u>6</u>	0,28	0,68	273 s 261	241	1,39	0,37 0,33
Trimer <u>8</u>	0,18		274 s 260	232	1,42	0,58 0,54
Trimer <u>9</u>	0,17	0,51	275 s 261	232	1,41	
Tetramer <u>10</u>	0,24	0,57	275 s 260	232	1,39	0,72 0,74
Heptamer <u>12</u>	0,27	0,54	273 s 260	239	1,39	1,22 1,28

a) Kieselgel-DC-Folien in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (E= 9/1 , F= 9/2)

b) gemessen in MeOH ; zur Berechnung folgende ϵ -Werte verw.:
 $\epsilon_{472}(\text{MMTr}^+) = 55000$, $\epsilon_{280}(\text{T}) = 6400$, $\epsilon_{280}(\text{dG}^{\text{ibu}}) = 11500$

c) s = Schulter (Wendepunkt) ϵ_{280} -Werte von KHORANA ⁹³.

7.5. Analyse des synthetisierten Oligonucleotides

Die Basenzusammensetzung des Heptameren sollte durch eine enzymatische Spaltung mit Schlangengift-Phosphodiesterase (vergl. S.50 Abschnitt 4.4.) bestimmt werden. Da dieses Enzym ein Oligonucleotid nur vom freien 3'-Hydroxylende her abbaut, ist das Heptamere, das am 3'-Ende ja eine Phosphatgruppe trägt, kein geeignetes Substrat und wird somit nicht gespalten werden. Um dennoch eine Enzymspaltung mit Schlangengift-Phosphodiesterase durchführen zu können, mußte das Heptamere mit einem Nucleosid zu einem Octameren ohne endständige Phosphatgruppe kondensiert werden. Im folgenden Abschnitt wird diese Synthese beschrieben.

7.5.1. Synthese des Octameren d-TGGGTGGT

Eine kleine Menge des Heptanucleotides ($2,5 \cdot 10^{-3}$ mmol) wurde nach der Abspaltung der β -Cyanoäthylgruppe mit einem 5fachen Überschuß an 3'-Acetylthymidin (dT_{AC}) kondensiert. Der gebildete Octanucleotidtriester wurde dann über eine kleine Kieselgelsäule abgetrennt. Trotz langen Eluierens mit bis zu 10% MeOH-Gehalt konnte das Produkt nur unvollständig von der Säule gewaschen werden, so daß eine relativ niedrige Ausbeute von 40% resultierte. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß mit solch kleinen Substanzmengen an der untersten Grenze der für Kieselgel-Säulen geeigneten Mengen gearbeitet wurde. Mit weniger Substanzverlusten durch irreversible Adsorption am Kieselgel sollten sich Trennungen von kleinen Oligonucleotidtriester-Mengen mit Kieselgel-Dünnschichtplatten durchführen lassen. Nach der Isolierung des vollgeschützten Octameren wurde das Lösungsmittel vorsichtig abgezogen und der Rückstand zur Schutzgruppenabspaltung eingesetzt.

7.5.2. Abspaltung der Schutzgruppen

Zuerst wurde die 5'-MMTr-Gruppe durch Behandlung mit Benzolsulfonsäurelösung (vergl. 7.2.4 S.77) abgespalten.

Nach der Extraktion der Benzolsulfonsäure und dem Abziehen des CHCl_3 konnte die Probe direkt zur Abspaltung der alkalilabilen Basen- und Phosphodiesterschutzgruppen weiterverwendet werden.

Die Abspaltung dieser Schutzgruppen durch eine alkalische Hydrolyse ist noch immer ein schwacher Punkt in der Triestermethode. Bedingt durch die Hydrolyseempfindlichkeit eines Phosphorsäuretriesters können nicht nur die Schutzgruppen entfernt, sondern statt dessen auch die Internucleotidbindungen gespalten werden ¹⁰¹. Dadurch entstehen neben dem ungeschützten Oliconucleotid auch noch Fragmente mit kürzerer Kettenlänge, die je nach Kettenlänge des ursprünglichen Oligomeren bis über 50% des ungeschützten Materials betragen können. In einer anderen Nebenreaktion können durch den nucleophilen Angriff freier 3'- oder 5'-Hydroxylgruppen auf die Phosphotriestergruppen cyclische Triester ausgebildet werden ¹⁰². Zur Unterdrückung dieser Reaktionen, die die Ausbeute an ungeschütztem Endprodukt beträchtlich verringern, wurden leichter hydrolysierbare Schutzgruppen ¹⁰⁰ oder spezielle Abspaltungsbedingungen ^{103,104} vorgeschlagen; keine dieser Methoden vermag jedoch Nebenreaktionen völlig auszuschließen. Da wir mit diesen Methoden noch keine Erfahrungen besaßen, führten wir die alkalische Hydrolyse nach NARANG ³⁸ mit konz. NH_3 -Lösung bei 50°C durch. Anschließend wurde das Produkt über eine Sephadex-G 75-Gelfiltration von den Schutzgruppen und den kurzkettigen Fragmenten abgetrennt. Die Endaufreinigung des Octameren erfolgte dann auf PEI-Cellulose-Dünnschichtplatten (vergl. S.50). Bedingt durch die geringe Menge an geschütztem Octameren (ca. 30 OD₂₆₀), die zur Schutzgruppenabspaltung eingesetzt werden konnte, und die Verluste bei den diversen Aufreinigungsschritten, von denen vor allem die Rückgewinnung von der PEI-Cellulose sehr unvollständig war, stand zur Analyse nur eine Menge von ca. 0,4 OD₂₆₀ reinen ungeschützten Octameren zur Verfügung.

Bei den kleinen Mengen, die zur enzymatischen Analyse vorlagen, mußte eine empfindliche Methode herangezogen werden, um das aus der enzymatischen Hydrolyse resultierende Gemisch aus Nucleosid und Nucleosid-5'-monophosphaten zu trennen und quantitativ zu erfassen. Dünnschicht- und papierchromatografische Verfahren schieden daher als Trennmedium aus; als geeignete Methode erwies sich dagegen die Hochdruck-Flüssigkeitschromatografie, die in kurzer Zeit gut reproduzierbare Ergebnisse lieferte.

Die Trennung von Nucleosiden und Nucleotiden mit Hilfe der HPLC wurde von mehreren Autoren beschrieben^{39,105}. Diese Trennungen nutzen die unterschiedliche Protonierung der Nucleobasen aus und werden bevorzugt im sauren pH-Bereich mit Anionenaustauschersäulen durchgeführt. Uns stand ein relativ stark saurer Anionenaustauscher (Lichrosorb AN von Merck) zur Verfügung, an dem mit verschiedenen Puffersystemen Testgemische getrennt wurden. Mit einer 0,12 M KH_2PO_4 Lösung, die mit H_3PO_4 auf pH 3,5 eingestellt worden war, konnte eine gute Auftrennung der Desoxynucleotide erreicht werden. Die Identifizierung der Bestandteile eines Enzym-Hydrolysates läßt sich so mit Hilfe der Retentionszeiten und der charakteristischen Extinktionsverhältnisse E_{254}/E_{280} (bei Verwendung einer 2-Kanal-UV-Meßzelle) vornehmen, wie aus Tab.15 und Abb.29 S.90 zu erkennen ist. Mit dem hier verwendeten Trennsystem ist aber eine quantitative Bestimmung der Nucleoside dG oder dA in Gegenwart des Nucleotides mit der kürzesten Retentionszeit pdC nicht möglich, so daß vor der Trennung auf der HPLC-Säule das Nucleosid abgetrennt und quantitativ erfaßt werden muß. Diese Nucleosid-Abtrennung kann auf einfache Weise bei der enzymatischen Hydrolyse mit Hilfe eines immobilisierten Enzympräparates¹⁰⁶ erfolgen, ohne daß ein gesonderter Trennschritt erforderlich wird. Im Fall des hier zu analysierenden Octameren konnte das Nucleosid (dT) jedoch zusammen mit den Nucleotiden in der Anionenaustauscher-HPLC erfaßt werden. Aus dem Elutionsdiagramm läßt sich dann über die Peakfläche und den Extinktionskoeffizienten des jeweiligen Nucleotides die Basenzusammensetzung bestimmen.

Tab.15 und Abb.29: Trennung von Desoxyribo-Nucleotiden und -Nucleotiden mit einer Anionenaustauscher-HPLC

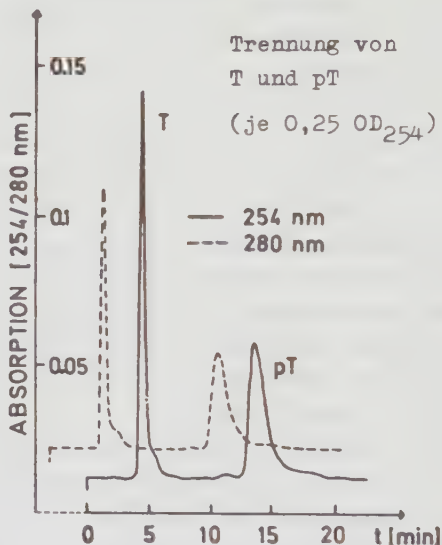
Sub- stanz	Reten- tions- zeit (min)	$\frac{E_{254}}{E_{280}}$
dC	3,4	0,36
dT	4,4	1,48
dG	7,6	2,17
pdC	5,2	0,37
pT	13,7	1,5
pdA	23	6,4
pdG	38	2,1

Säule: Lichrosorb AN
250 x 4 mm

Puffer: 0,12 M KH_2PO_4
(pH 3,5)

Elutionsgeschwindigk.:
0,8 ml/min

Druck: 550 psi



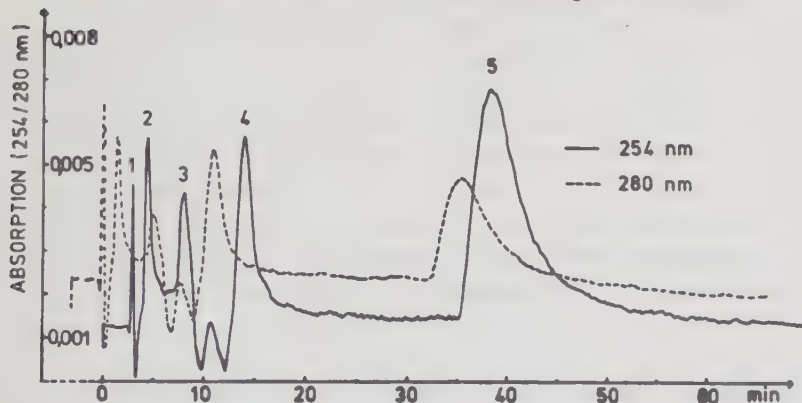
Zur Analyse des Octameren d-TGGGTGGT mit Schlangengift-Phosphodiesterase wurden ca. 0,1 OD_{260} mit dem Enzym 12 h inkubiert und nach der Abtrennung der Phosphodiesterase, die mit Con A-Sepharose (an Sepharose immobilisiertes Concanvalin A) gebunden wurde¹⁰⁷, direkt in die HPLC-Anlage eingespritzt.

Eine auf die gleiche Weise inkubierte Blindprobe mit dem Nucleotid pdG zeigte auf dem HPLC-Elutionsdiagramm kein Nucleosid dG, so daß eine Phosphataseaktivität der Schlangengift-Phosphodiesterase ausgeschlossen werden konnte.

Die Trennung des Enzymsatzes des Octameren ist in Abb.30 auf Seite 91 dargestellt. Aus diesem Elutionsprofil wurde folgende Basenzusammensetzung berechnet: dT:pT:pdG = 1 : 2,1 : 4,7 (theor.: 1:2:5). Im Rahmen der Meßgenauigkeit bei solch kleinen Substanzmengen konnte somit die Zusammensetzung des Octameren und indirekt auch die des

Heptameren bestätigt werden.

Abb.30: HPLC-Trennung der enzymatischen Hydrolyse von d-TGGGTGGT mit Schlangengift-Phosphodiesterase



Säulendimension und Elutionsbedingungen wie bei Abb.29 S.90

1=Einspritzpeak(Puffer) , 2= dT , 3= nicht identifiziert
4= pT , 5= pG

7.6. Abschließende Bemerkung zur Triestersynthese

Die zu dieser Synthese verwendete Methode nach NARANG³⁸ hat sich als gutes Syntheseprinzip erwiesen. Bei ausreichender Reinheit der Ausgangsprodukte, die sich durch den Einsatz des monofunktionellen Phosphorylierungsmittels erzielen ließ, verliefen die Kondensationsreaktionen übersichtlich und lieferten die erwarteten Produkte ohne Bildung von schwer abzutrennenden Nebenprodukten. Zwar wurden teilweise keine sehr hohen Ausbeuten erreicht, was aber fast ausschließlich auf Schwierigkeiten bei den Kieselgel-Säulentrennungen zurückzuführen war. Diese Probleme konnten im Laufe der Arbeit weitgehend gelöst werden, so daß bei weiteren Synthesen mit günstigeren Ausbeuten zu rechnen ist.

Inzwischen wurden von einigen Arbeitsgruppen^{17,104} alternative Triesterverfahren beschrieben, die schneller und einfacher sein sollen; in einem umfangreichen Syntheseverfahren sind diese Methoden aber noch nicht getestet worden.

V. Diskussion der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden mehrere verschiedene Methoden zur Synthese von Desoxyribooligonucleotiden spezifischer Sequenz untersucht. Diese Methoden zielten einerseits auf die Synthese von Oligonucleotiden mit ungeschützter Internucleotidbindung, andererseits auf die Synthese von Oligonucleotiden mit geschützter Internucleotidbindung ab.

Im folgenden sollen zunächst die Methoden zur Synthese von Oligonucleotiden mit ungeschützter Internucleotidbindung besprochen werden, die im wesentlichen auf der Cooligokondensation von Nucleotidbausteinen beruhen. Anschließend wird ein Vergleich dieser Methoden mit dem schrittweisen Triesterverfahren durchgeführt.

Cooligokondensationsverfahren nach der Diestermethode:

Um Sequenzen von biologischem Interesse mit Hilfe des Cooligokondensationsverfahrens aufbauen zu können, wurde im Verlauf meiner Arbeit versucht, geeignete Lösungen für folgende Teilprobleme zu finden:

- Übertragung der Synthesemethoden auf Ansätze in größerem Maßstab.
- Regulation von Ausbeute und mittlerer Kettenlänge der Cooligomeren.
- Affinitätstrennung.
- Auftrennung der homologen Cooligomerenreihe nach Kettenlänge.
- 5'-Phosphorylierung eines Oligonucleotides.
- Blockkondensation.

In der Regulation des Verlaufes einer Cooligokondensation konnten gegenüber bisherigen Arbeiten einige Fortschritte erzielt werden. Bereits im Verlauf der Diplomarbeit wurde gezeigt, daß durch größere Überschüsse an Nucleotidkomponente jede einzelne Sequenz aus dem Cooligomerengemisch in ähnlich guten Ausbeuten wie in der schrittweisen Synthese ⁸⁵ zu gewinnen ist ^{31,29}. In der präparativen Arbeit

ist es jedoch zweckmäßig, die Nucleotid-Überschüsse klein zu halten, um nicht zuviel Ausgangsprodukt durch Bildung der weniger interessierenden Homooligomeren zu verlieren. Bei den in der Doktorarbeit ausgeführten Arbeiten in größerem Maßstab, die zur Gewinnung von Fragmenten für die Synthese eines Polynucleotides mit biologischer Bedeutung herangezogen werden sollten, wurde daher generell nur ein 3-4facher Überschuß an Nucleotidkomponente (bezogen auf das Nucleosid) eingesetzt.

Die Zusammensetzung der Produkte (Kettenlängenverteilung) konnte in geringen Grenzen variiert werden, eine Steigerung der mittleren Kettenlänge auf Werte über 3 bis 3,3 scheint aber kaum möglich zu sein, so daß man in guter Ausbeute nur noch Cooligomere mit einer Kettenlänge von 3 bis 4 erhalten kann. Die niedrigen Ausbeuten an Cooligomeren mit größerer Kettenlänge dürfte darin begründet sein, daß das eingesetzte Nucleotid N^2 -Isobutyryl-desoxyguanosinmonophosphat allgemein eine geringe Neigung zur Bildung von Internucleotidbindungen und somit zur Polykondensation besitzt.

Für die Auftrennung größerer Cooligokondensationsansätze ist die Frage der Trennkapazität des affinitätschromatografischen Trennverfahrens von großer Wichtigkeit. Die quantitative Bestimmung der Trennkapazität von Tritylcellulose mit Hilfe von Testsubstanzen zeigte die Wirksamkeit aber auch die Grenzen dieser Methode sehr deutlich. Vor allem die geringe Trennkapazität der Tritylcellulose für monomethoxytritylierte Oligonucleotide sowie die Abnahme dieser Kapazität mit steigender Kettenlänge der Oligonucleotide bedingen einen großen Materialeinsatz an Tritylcellulose. Zwar kann man die Trennkapazität einer Tritylcellulose-Säule dadurch erhöhen, daß man zunächst einen Elutionspuffer mit geringerem Äthanolgehalt als 30% verwendet (Verstärkung der hydrophoben Wechselwirkungen). Dies hat jedoch zur Folge, daß die Cooligomeren mit kleinen Mengen (ca. 5-8%) an Homooligomeren verunreinigt werden. Man muß also von Fall zu Fall entscheiden, ob man sehr saubere Produkte erhalten will, oder ob man auf eine höhere

Trennkapazität Wert legt. Für Cooligokondensationsansätze mittlerer Größe (ca. 0,1 bis 0,5 mmol an Nucleotid) stellt die Tritylcellulose aber auf jeden Fall ein schnelles und zuverlässiges Affinitätstrennmateriel dar.

Aus Abb.10 (S.32) zeigt sich, daß mit ansteigender Kettenlänge der Cooligomeren eine Abnahme der Kapazität zu verzeichnen ist. Wenngleich eine lineare Extrapolation der Meßwerte nicht ohne weiteres erlaubt ist, so ist doch abzusehen, daß die Trennkapazität der Tritylcellulose unter den angewandten Bedingungen bei Kettenlängen unter 10 sehr gering werden dürfte. Die hydrophoben Wechselwirkungen bei längeren Oligonucleotidketten werden dann wohl durch die Hydrophilie der poly-anionischen Kette überkompensiert. Daß dieser Effekt schon bei relativ kleinen Kettenlängen auftritt, überrascht angesichts der Tatsache, daß die Einführung eines einzigen aromatischen Restes am Acceptor-Ende einer t-RNS die nicht-ionischen Wechselwirkungen zwischen der t-RNS und einer benzozylierten DEAE-Cellulose drastisch erhöht ⁵².

Die Auftrennung der Cooligomeren auf DEAE-Cellulose ist ein gewisser Engpaß bei der Herstellung größerer Mengen. Setzt man eine hohe Kapazität an Säulenmaterial ein, dann erfolgt die Trennung mit ausreichender Schärfe, es sind aber deutliche Substanzverluste zu beobachten. Bei einer höheren Kapazitätsauslastung der DEAE-Cellulose-Säulen könnten diese Verluste weitgehend vermindert werden, allerdings muß dann eine geringere Schärfe der Trennung in Kauf genommen werden. Mit Hilfe verfeinerter Trenntechniken ⁶⁴ sollte hier aber ein guter Kompromiß gefunden werden können. Durch das Vorschalten einer Extraktionsstufe konnte bereits die notwendige Menge an Trityl- und DEAE-Cellulose auf etwa die Hälfte gesenkt werden.

Eine optimale Lösung, nämlich die gleichzeitige Trennung nach Kettenlänge und Affinität mit einem Trennmateriel, konnte nicht gefunden werden, obwohl die Trennversuche mit Sephadex-LH 60 zumindest teilweise dieser Forderung entsprachen.

Zur 5'-Phosphorylierung eines Oligonucleotidblocks wurden zwei Methoden herangezogen (mit β -Cyanoäthylphosphat und mit POCl_3 ⁷¹). Die Phosphorylierung mit β -Cyanoäthylphosphat ergab zwar einen höheren Umsatz zum 5'-phosphorylierten Oligonucleotid als die Verwendung von POCl_3 , insgesamt ist aber letztere Methode wegen des geringeren Arbeitsaufwandes (z.B. Schutzgruppenreaktionen) geeigneter, um Oligonucleotide auch in größerem Maßstab zu phosphorylieren. Verluste an wertvollem Zwischenprodukt (5'-HO-Oligonucleotid) sind aber auch hier nicht zu umgehen.

Die Blockkondensation des phosphorylierten Trimeren mit einem ebenfalls aus dem Cooligokondensationsverfahren gewonnenen Tetrameren konnte nicht mit Erfolg ausgeführt werden. Obwohl das 5'-phosphorylierte Trimere einwandfrei charakterisiert und dessen Struktur bestätigt wurde, gelang damit keine Umsetzung mit einer 3'-Hydroxylkomponente, deren Struktur auch bestätigt wurde, unter Ausbildung einer neuen Internucleotidbindung. Blockkondensationen verlaufen allgemein mit niedrigen Ausbeuten ^{108,109} besonders bei dG-enthaltenden Oligonucleotiden. Für das völlige Ausbleiben der Verknüpfung beider Blöcke im vorliegenden Fall muß aber noch ein anderer Umstand verantwortlich sein. Aus den Testreaktionen mit diesen Blöcken geht hervor, daß das 5'-phosphorylierte Oligonucleotid der inaktive Reaktionspartner ist. Eine eindeutige Erklärung für diese Reaktionsträgheit konnte aus den durchgeführten Experimenten nicht gefunden werden. Ob Assoziatbildungen, die bei dG-enthaltenden Oligonucleotiden beobachtet worden sind ^{110, 80}, oder eine besonders starke Neigung zur Bildung von intra- oder intermolekularen Pyrophosphaten ⁸² des aktivierten Oligonucleotides für diese "Inaktivierung" verantwortlich sind, müßte durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Schrittweise Synthese nach der Triestermethode:

Um diese - aus dem Verlauf der Diester-Blockkondensation

erwachsenen - Nachteile zu umgehen, wurde die Synthese des Oligonucleotides d-TGGGTGG nach dem Triesterverfahren durchgeführt.

Hierzu mußten wegen des unterschiedlichen Aufbauprinzips (vergl. Abschnitt III.3 S.12) zunächst nochmals die einzelnen Baublöcke synthetisiert werden. Dies gelang schnell und in zufriedenstellenden Ausbeuten, da

- die geschützten Monomeren leicht in größeren Mengen hergestellt werden konnten, und ihre Aufreinigung mit Hilfe der Kieselgel-short-column-Chromatografie⁹² auf einfache Weise durchgeführt werden konnte.
- die Kondensationsreaktionen, wie orientierende Dünnschichtchromatogramme zeigten, auf der Stufe der Darstellung geschützter Dimeren-Blöcke fast quantitativ verliefen.

Auch die Verknüpfung der Baublöcke gelang nach der Triestermethode in guten Ausbeuten.

Bei den Säulentrennungen mit Kieselgel traten zwar Substanzverluste auf, die aber gegen Ende der Arbeit weitgehend verhindert werden konnten. Schwierigkeiten traten lediglich bei der Abspaltung der Schutzgruppen für die Internucleotidbindung auf. Hierbei war eine teilweise Fragmentierung des Oligonucleotides nicht zu vermeiden, wodurch Probleme bei der Reinigung und Isolierung des ungeschützten Oligonucleotides entstanden.

Der auffallend günstigere Verlauf der Triestersynthese im Gegensatz zu den vorausgegangenen Versuchen auf der Basis des Diesterverfahrens fordert zu einem

Vergleich der beiden Synthesemethoden heraus:

- 1) Die Synthese der Monomeren erfordert bei der Triestermethode einen höheren Zeit- und Arbeitsaufwand zum Einführen von Schutzgruppen als die Darstellung der geschützten Nucleosid-5'-monophosphate, die in der Diestermethode eingesetzt werden. Von Vorteil ist dagegen, daß im Triesterverfahren von den preisgünstigeren Nucleosiden ausgegangen werden kann.

- 2) Das Knüpfen einer Internucleotidbindung verläuft bei der Triestervariante mit deutlich höheren Ausbeuten auch ohne großen Überschuß einer Komponente. Von besonderem Vorteil ist, daß auch bei Blockkondensationen keine starke Ausbeuteverminderung an Internucleotidbindung zu verzeichnen ist. Dies ist darauf zurückzuführen, daß Nebenreaktionen, welche auf der primären Aktivierung der Phosphodiestergruppen eines Oligonucleotid-Diesterblocks beruhen, nunmehr ausgeschlossen sind.
- 3) Im Diesterverfahren sind sowohl das Produkt einer Kettenverlängerung wie auch die Ausgangsmaterialien negativ geladen. Die Abtrennung des Produktes erfolgt dann auf Grund der erhöhten Zahl der negativen Ladungen. Beim Triesterverfahren ist das Produkt der Kettenverlängerung stets eine neutrale Substanz. Nur die Ausgangsverbindungen sind noch negativ geladen (was gegebenenfalls die Nachphosphorylierung der 5'-Hydroxylkomponente voraussetzt - man vergleiche Schema 20 S.81). Die Trennung erfolgt jetzt nach Art einer Affinitätstrennung auf Kieselgel in geladene und ungeladene Substanzen. Das gewünschte Oligonucleotid wird dabei als erstes eluiert im Gegensatz zur Trennung auf DEAE-Cellulose beim Diesterverfahren, wo das Produkt höherer Ladung am stärksten retardiert wird. Das einfache Prinzip dieser "Affinitätstrennung" bleibt auch bei der Triester-Blockkondensation erhalten, während bei Blockkondensationen nach der Diestermethode Sequenz- und Kettenlängebedingte Schwierigkeiten auftreten können.

Insgesamt ergibt sich durch das Triesterverfahren zwar eine Komplizierung der Schutzgruppenstrategie, die aber durch die Vorteile auf dem Gebiet der Kondensationsreaktionen und der Trennungen mehr als wettgemacht wird. Die verstärkte Anwendung der Techniken der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatografie sollte das Triesterverfahren in dieser Hinsicht noch weiter verbessern.

Der Grundgedanke des Cooligokondensationsverfahrens (siehe Abschnitt III.5 S.15) ist sowohl mit der Diester- als auch mit der Triestervariante vereinbar. Ob die Synthese von Oligonucleotid-Blöcken nach dem Cooligokondensationsschema auch mit der Triestermethode durchgeführt werden kann, hängt nicht nur vom Gelingen der Kondensationsreaktion ab, sondern vor allem von der Übertragung der notwendigen Trennschritte auf ungeladene Oligonucleotide. Hierzu müßten geeignete Verfahren zur Affinitäts-trennung und zur Trennung der Homologen nach Kettenlänge in organischen Lösungsmitteln zur Verfügung stehen. Eine Möglichkeit, diese Trennungen in organischen Lösungsmitteln zu verwirklichen, könnte die Verwendung der Lipoyl-Affinitätsschutzgruppe ⁵³ in einer Hg-S -Wechselwirkung und die Gelchromatografie mit hydrophoben Gelen ⁵⁹ (z.B. Sephadex-LH) darstellen.

VI. Zusammenfassung

Am Beispiel der Synthese des Desoxyribo-Oligonucleotides d-TGGGTGG, das Teil einer Sequenz mit biologischer Bedeutung ist, wurden unterschiedliche Methoden zur chemischen Synthese von Desoxyribo-Oligonucleotiden spezifischer Sequenz untersucht und miteinander verglichen.

Zunächst wurden kurzkettige Oligonucleotid-Blöcke des Typs $T(pdG)_n$ (mit $n \leq 5$) in einem Cooligokondensationsverfahren nach der KHORANA'schen Diestermethode dargestellt. Die Zusammensetzung des Produktgemisches ließ sich durch Variation des Mengenverhältnisses der Ausgangssubstanzen innerhalb enger Grenzen beeinflussen. Produkte mit Kettenlängen größer 4 bis 5 konnten aber nicht in nennenswerter Ausbeute gewonnen werden.

Innerhalb der Synthesen nach dem Cooligokondensationsverfahren mußte ein affinitätschromatografischer Trennschritt durchgeführt werden. Hierzu wurden hydrophobe Wechselwirkungen zwischen 5'-MMTr-geschützten Oligonucleotiden und Tritylcellulose ausgenutzt. Die quantitative Bestimmung dieses Affinitätstrennprinzips zeigte, daß man es sinnvoll zur Synthese von Oligonucleotiden in einem Cooligokondensationsverfahren nur in kleinerem bis mittlerem Maßstab einsetzen sollte.

Zur geplanten Verknüpfung zweier aus der Cooligokondensation gewonnenen Oligonucleotide wurden mehrere Methoden zur 5'-Phosphorylierung geschützter Oligonucleotide getestet. Die Blockkondensation eines auf diese Weise phosphorylierten Trimeren mit einem Tetrameren nach der Diestermethode konnte nicht mit Erfolg durchgeführt werden.

Alternativ wurde die Synthese des Heptanucleotides in einem Triesterverfahren nach der Methode von NARANG untersucht. Mit dieser Methode, die eine vereinfachte Synthese der monomeren Ausgangsprodukte sowie eine verbesserte Trenntechnik auf Kieselgel-Säulen beinhaltet, konnte das Heptanucleotid schnell und in guten Ausbeuten synthetisiert werden.

VII. Experimenteller Teil

Chemikalien:

Die Nucleoside und Nucleotide wurden von den Papierwerken Waldhof-Aschaffenburg bezogen;
 MS, MST, 1,2,4 Triazol, 1H-Tetrazol, 3-Hydroxypropionitril, p-Chlorphenol, POCl_3 von Fluka, Neu-Ulm;
 TPS, DCC, MMTr-Cl, N-Methylimidazol, Triäthylamin von EGA-Chemie, Steinheim;
 Dextranblau, Methylorange, Xylencyanol FF von Serva, Heidelberg;
 Isobuttersäureanhydrid, Isobuttersäurechlorid, N,N-Diisopropyläthylamin, Benzolsulfonsäure von Merck, Darmstadt.

Lösungsmittel:

Alle Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und je nach Verwendungszweck absolutiert. Wasser war stets bidestilliert. Pyridin wurde über p-Toluolsulfonylchlorid und KOH destilliert; zu Kondensationszwecken wurde es nochmals über CaH_2 destilliert und über Molekularsieb (4A) aufbewahrt.

TBK-Puffer wurde als 1 M Stammlösung durch Einleiten von CO_2 in eine Mischung von Triäthylamin und Wasser unter Eiskühlung hergestellt und im Kühlschrank aufbewahrt.

UV-Spektroskopie:

Die Aufnahme von UV-Spektren erfolgte mit dem ZEISS Spektrograph DMR 21; Extinktionsbestimmungen wurden mit dem ZEISS Spektralphotometer PMQ II durchgeführt. Zur Aufzeichnung von Elutionsdiagrammen bei Säulenchromatografien wurde die UV-Meßzelle (254 oder 280nm) Uvicord II der Firma LKB verwendet.

Zur Ausbeutebestimmung mit Hilfe der UV-Absorption wurden folgende molare Extinktionskoeffizienten eingesetzt:

$$\begin{array}{ll} \text{T: } \epsilon_{260} = 8900 & \epsilon_{280} = 6400 \\ \text{dG}^{\text{ibu}}: \epsilon_{260} = 16600 & \epsilon_{280} = 11500 \end{array} \quad (\text{KHORANA } 93)$$

Chromatografische Verfahren:

Zur Papierchromatografie wurden Papierbögen Nr. 2043b der Firma Schleicher&Schüll mit Keilstreifen eingesetzt; vor der Auftrennung ungeschützter Oligonucleotide und deren Enzymhydrolysaten wurden die Papierbögen mit 0,05 M NaOH, 0,05 M HCl, 0,05 M EDTA und H₂O bidest. gewaschen. Es wurde in absteigender Technik chromatografiert. Die Isolierung der aufgetrennten Substanzen erfolgte durch Elution der entsprechenden Spots auf dem Papier mit 5 oder 10 ml 0,01M TBK-Puffer oder verd. Ammoniak, Produkte einer Enzymspaltung wurden mit 0,01 N HCl eluiert. Zur Aufnahme der UV-Spektren der eluierten Substanzen wurde als Referenz das Eluat eines entsprechend behandelten Blindflecks verwendet.

Zur Dünnschichtchromatografie wurden verwendet, DC-Plastikfolie Kieselgel 60 F₂₅₄ (0,2 mm , Nr.5735) , DC-Plastikfolie Cellulose F₂₅₄ (0,1 mm , Nr.5565), DC-Plastikfolie PEI-Cellulose F (0,1 mm , Nr.5579) , alle von Merck; die PEI-Cellulose-Folien wurden vor Gebrauch mit Methanol und H₂O bidest. gewaschen.

Zur Säulenchromatografie wurden verwendet, DEAE-Cellulose DE 32 (Whatmann, England), Sephadex G-25 u. G-75 (Pharmacia, Schweden), Bio-Gel P-2 u. P-30 (Bio Rad, Richmond), Kieselgel 0,2-0,5mm (Macherey&Nagel, Düren und Merck Nr.7735), Kieselgel 60 0,06-0,2mm (Merck Nr.7734).

Folgende Laufmittelsysteme wurden verwendet,

LM A : Äthanol-1 M Ammoniumacetat (pH 7,5) = 7:3
 LM B : Isopropanol-konz.Ammoniak-H₂O = 7:1:2
 LM C : n-Propanol-konz. Ammoniak-H₂O = 55:10:35
 LM D : Acetonitril-H₂O = 85:15
 LM E : Chloroform-Methanol = 9:1
 LM F : Chloroform-Methanol = 8:2
 LM G : 0,6 M LiCl- 7 M Harnstoff- 0,025 M TrisHCl (pH 8,5)

Zur Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatografie standen zur Verfügung, Pumpe M 6000 A (WATERS), Anionenaustauscher-Säule Lichrosorb AN 10 μ m 250-4 mm (Merck Nr. 50143) , Zwei-Kanal UV-Recorder mit 20 μ l analyt. Meßzelle (Altex 152), Zwei-Kanal Schreiber (Omniscribe Houston instrument) .

Messung der Radioaktivität:

Ein Aliquot (0,5 ml) der Probelösung wurde mit 5ml Insta-Gel (von Packard) in ein Zählfläschchen gegeben, geschüttelt und mit dem Flüssigkeitsszintillationszähler MARK II Modell 6849 (SEARLE Analytic Inc.) vermessen.

Beschreibung der Versuche:

A Synthese nach dem Cooligokondensationsverfahren in der Diestermethode

B Synthese eines Oligonucleotides nach dem Triesterverfahren

A 1 Synthese der Ausgangsprodukte:

5'-O-Monomethoxytrityl-thymidin (5'-MMTrT)

wurde nach Schaller et al.⁹¹ durch Umsetzung von Thymidin mit MMTr-Cl in Pyridin dargestellt. Nach zweimaligem Umfällen aus Petroläther wurde ein dünnschichtchromatografisch reines Produkt erhalten (Ausbeuten ca. 75-80% , R_f -Werte auf Kieselgel-DC: LM E = 0,46 , LM F = 0,68 , LM D = 0,75).

N²-Isobutyryl-3'-O-isobutyryl-desoxyguanosin-5'-phosphat

wurde nach der Vorschrift von BÜCHI und KHORANA⁹³ synthetisiert. Bei der Überführung des Natriumsalzes des Desoxyguanosin-5'-phosphates in dessen Pyridiniumsalz mit Hilfe eines Kationenaustauscher (Dowex 50 WX 8 in der Pyridiniumform) konnten nur ca. 90% des Nucleotides vom Ionenaustauscher zurückgewonnen werden. Die Umsetzung des Nucleotids mit Isobuttersäureanhydrid in Pyridin gelang bei einer Charge pdG nicht, da sich das Nucleotid auch nach Tagen nicht im Pyridin löste und somit nicht mit dem Säure-

anhydrid reagierte. Die Ausbeuten an $\text{pdG}_{\text{Ibu}}^{\text{ibu}}$ lagen zwischen 70 u. 80%. (UV-Daten: $\lambda_{\text{max}}=258\text{nm}$, $\lambda_{\text{min}}=228\text{nm}$, $E_{260}/E_{280}=1,38$, R_f -Werte rel. zu pT auf Papier: LM A =1,47 , LM B=5.4).

N^2 -Isobutyryl-desoxyguanosin-5'-phosphat

wurde aus $\text{pdG}_{\text{Ibu}}^{\text{ibu}}$ durch alkalische Hydrolyse (2 N NaOH, 0°C , 7 min) hergestellt. Zur schnellen Neutralisation mußte das zweifache Volumen (bezogen auf 2N NaOH) an Ionenaustauscher (DOWEX in Pyridiniumform) zugegeben werden. Ausbeute ca. 70-80% (bezogen auf $\text{pdG}_{\text{Ibu}}^{\text{ibu}}$). (UV-Daten: siehe oben , R_f -Werte rel. zu pT auf Papier: LM A=1,17 , LM B= 3,14).

A 2 Cooligokondensationen von 5'-MMTrT mit $\text{pdG}_{(\text{Ibu})}^{\text{ibu}}$:

Allgemeine Reaktionsbedingungen:

Nucleosid und Nucleotid wurden in wenig absolutem Pyridin gelöst und im Vakuum bis fast zur Trockene eingeengt. Nach Belüftung über ein P_2O_5 -Trockenrohr wurde wieder Pyridin zugegeben und obiger Vorgang noch zweimal wiederholt (Absolutieren). Dann wurde ein 2-3facher Überschuß an TPS (bezogen auf Nucleotid) zugegeben—das Kondensationsmittel war vorher aus n-Pentan umkristallisiert worden—und die Lösung soweit engeengt, daß eine ca. 1-5 molare Nucleotid-Konzentration resultierte. Unter Rühren wurde 4-6 h bei Raumtemperatur kondensiert. Der Abbruch der Reaktion erfolgte bei 0°C durch Zugabe einer 1 M Diisopropyläthylamin-Lösung in Pyridin (2facher Überschuß pro mol Kondensationsmittel). Anschließend wurde Wasser/Pyridin (1:1) zugegeben (ml = Gesamtvolumen des Ansatzes). und 24 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zur Abspaltung der 3'-Isobutyryl-Schutzgruppe wurde bei 0°C mit 2N NaOH (es wurde soviel zugegeben, daß im Ansatz eine 1 M NaOH-Konzentration erreicht wurde) 7 min hydrolysiert. Die Neutralisation erfolgte wie oben beschrieben. Nachdem vom Ionenaustauscher abfiltriert und gründlich mit 20% wässrigem Pyridin gewaschen worden war, wurde die Lösung weitgehend einrotiert und in 0,05M TBK-Puffer (pH 7,5) aufgenommen (ca. 10ml pro 0,1 mmol Nucleotid). Durch dreimalige Extraktion mit Äther (je 5ml auf 10ml Puffer)

wurde das MMTrT vollständig entfernt (Prüfung auf DC). Die vereinigten Ätherphasen wurden einmal mit Puffer rückextrahiert und die wässrigen Phasen zusammengegeben. Diese Lösung wurde dann direkt auf die Tritylcellulose zur Affinitätschromatografischen Trennung aufgetragen (siehe weiter unten A 3), oder das Dimere MMTrT(pdG^{ibu}) wurde auch noch extraktiv entfernt. Dazu wurde 5 mal mit Essigester (je 5ml auf 10ml wässrige Phase) ausgeschüttelt. Durch ein Kieselgel-DC in LM D wurde geprüft, ob noch Dimeres ($R_f = 0,58$) in der wässrigen Phase vorhanden war. Wenn dies der Fall war, wurde noch einmal mit Essigester/n-Butanol (9:1) extrahiert. Die organischen Phasen wurden einmal mit Puffer rückextrahiert und die wässrigen Phasen vereinigt. Die Bestimmung der Extinktion bei 472nm (in 70% HClO₄) in der Ätherphase und in den Essigesterphasen lieferte den Gehalt an MMTrT bzw. MMTrTpdG^{ibu}. Die Anzahl der mmol Cooligomeren MMTrT(pdG^{ibu})_n mit $n > 2$ konnte aus der Extinktion bei 472nm in der wässrigen Phase berechnet werden.

Die wässrige Phase wurde unter Zugabe von Pyridin weitgehend eingeeengt, und vor der Trennung auf Tritylcellulose im Startpuffer gelöst.

Mengenangaben zu den Cooligokondensationsansätzen aus Tab.2 S.22 :

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
mmol MMTrT	0,1	0,016	0,1	0,14	0,11	0,2	0,2	0,16
Extraktion MMTrT	+	+	+	+	+	+	+	+
Extraktion MMTrTpdG ^{ibu}	-	-	-	-	-	+	+	+

A 3 Affinitätstrennungen auf Tritylcellulose

Synthese von Tritylcellulose:

Es wurde nach einer Vorschrift von E.SIEFERT⁵⁷ gearbeitet, der auch freundlicherweise die Ausgangsmaterialien zur Verfügung stellte. 300g N-Äthylpyridiniumchlorid (aus Pyridin und Äthylchlorid unter Druck bei erhöhter Temperatur

hergestellt) wurde mit 150ml Dimethylsulfoxid bei 80°C unter Rühren aufgeschmolzen (Rückflußkühler!). In die Schmelze wurde langsam 18g Zellwolle (ca. 0,11mmol Glucose-Einheiten) gegeben. Nach 2h resultierte eine klare, hochviskose Lösung. Dann wurden 120ml Pyridin eingegossen, und danach 186g Tritylchlorid (0,66 mmol) eingerührt; die Lösung färbte sich dunkelrot. Nach einer Reaktionszeit von 4 h wurde in ca. 6 l Methanol unter kräftigem Rühren ausgefällt. Der rötlich gefärbte Niederschlag wurde abfiltriert, gut mit Methanol gewaschen, in Aceton/Pyridin (100:5) gelöst und nochmals aus Methanol gefällt. Es resultierte ein rötliches Pulver, das mehrere Tage mit Methanol extrahiert und dann getrocknet wurde. Die Elementaranalyse wies auf einen Substitutionsgrad von 1-1,1 hin (C-gef.=74,8% ,ber. =74,3% bei Substitution 1 ; H-gef.= 6,1% , ber. =5,92). Die Bestimmung des Gehalts an Tritylgruppen durch Abspaltung der Tritylgruppen mit 60% HClO₄ ergab einen Substitutionsgrad von 1,1 (verwendeter Extinktionskoeffizient für Trityl-Kation $\epsilon_{430} = 35200^{54}$). Vor der Verwendung als Säulenmaterial wurden faserige Bestandteile in einem Mörser etwas pulverisiert. Feine Partikel wurden durch Aufschlämmen in 50% Äthanol und Abdekantieren abgetrennt.

Affinitätstrennungen der Cooligokondensationsansätze auf Tritylcellulose:

Vor der Trennung wurde die Tritylcellulose-Säule mit 90% Äthanol/1M TBK gewaschen und dann mit Startpuffer (meist 30% Äthanol/0,1M TBK) äquilibriert. Die konzentrierte Pyridinlösung der Kondensationsprodukte (nach den Extraktionsschritten) wurde mit ca. 20ml Startpuffer verdünnt und in die Säule eingewaschen. Auf etwa 1000 OD₄₇₂ Cooligomere im Produktgemisch (=ca. $2 \cdot 10^{-2}$ mmol MMTr-) wurden 150 ml Säulenmaterial eingesetzt. Es wurde dann solange mit 30% Äthanol/0,1M TBK gewaschen bis die Extinktion des Eluates konstant und nahezu 0 war. Danach wurde mit 70% oder 80% Äthanol/0,1M TBK eluiert bis im Eluat die Extinktion wieder auf die Grundlinie zurückgegangen war. Aus dem Verhältnis E_{260}/E_{472} in der 70% Fraktion konnte auf die mittlere Kettenlänge der Cooligomeren geschlossen werden. Die Rückgewinnung

der Cooligomeren von der Tritylcellulose lag bei über 90% . Die affine Fraktion wurde unter mehrfacher Zugabe von Pyridin einrotiert und als Pyridin-Stammlösung bei -20°C aufbewahrt, oder es wurde aus Dioxan/ H_2O (Spur Pyridin) lyophilisiert.

Kapazitätsbestimmung der Tritylcellulose:

Gut getrocknete Tritylcellulose wurde abgewogen, in Äthanol aufgeschlämmt und quantitativ in eine kleine Säule überführt. Die Säule wurde gut mit 90% Äthanol/1M TBK gewaschen und dann mit Startpuffer äquilibriert. Säulendimensionen sind in Abb.8 (S.28) und in Abb.9 (S.30) angegeben. Die zu untersuchende Substanz ($\text{pdG}_{\text{Ibu}}^{\text{ibu}}$ o. Cooligomeres $\text{MMTrT}(\text{pdG}_{\text{Ibu}}^{\text{ibu}})_n$) wurde als Lösung von bekannter Konzentration (OD_{260} bzw. OD_{472} /ml gemessen) in jeweiligen Startpuffer in die Säule eingewaschen. Verwendete Konzentrationen: $\text{pdG}_{\text{Ibu}}^{\text{ibu}}$ ($10 \text{ OD}_{260}/\text{ml} = \text{ca. } 6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) , MMTrT u. $\text{MMTrT}(\text{pdG}_{\text{Ibu}}^{\text{ibu}})_n$ ($10 \text{ OD}_{472}/\text{ml} = \text{ca. } 1,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) . Es wurde solange mit der nucleotidischen Lösung eluiert, bis die Konzentration im Eluat gleichgroß wie die Startkonzentration war, dies wurde durch Extinktionsbestimmungen geprüft. Die Säule wurde dann mit Startpuffer gewaschen, bis die Extinktion des Eluates nahezu gleich Null war. Mit 80% Äthanol/0,2M TBK wurde dann der affin adsorbierte Anteil von der Säule gewaschen, und durch Messung der Extinktion bei 260nm u. gegebenenfalls bei 472nm (in 70% HClO_4) die Kapazität der Säule für das jeweilige Oligonucleotid ermittelt. Zur Kontrolle wurde aus dem Volumen, das vom Einwaschen der Lösung bis zum Ansteigen der Extinktion im Eluat durch die Säule gegeben wurde, ebenfalls die Menge an adsorbierter Substanz berechnet. Die gute Übereinstimmung der Werte zeigte, daß das retardierte Material wieder quantitativ von der Säule gewaschen worden war. Ergebnisse siehe Abschnitt 3.2.1 bis 3.2.3 (S.27-S.32).

A 4 Trennungen auf Sephadex LH-60 Gel

Sephadex LH-60 wurde über Nacht mit 0,1M TBK gequollen, von feinsten Partikeln befreit (Aufschlämmen u. Abdekantieren),

in die Säule gefüllt und dann mit Startpuffer äquili-
briert. Das Ausschlußvolumen der Säule wurde durch Auf-
tragen einer Dextranblau-Lösung und Messung des Volumens
an Elutionsmittel bis zum Ansteigen der Extinktion (UV-
Meßzelle) bestimmt; V_0 war praktisch unabhängig von den
hier verwendeten Äthanol-Konzentrationen. Zur Trennung
von Oligonucleotiden wurden diese in möglichst wenig Start-
puffer gelöst (maximal 3-5% des Säulenvolumens) und auf
die Säule gegeben. Nach dem vollständigen Einziehen in
das Säulenmaterial wurde mit Startpuffer eluiert. Die
eluierten Fraktionen wurden durch Messung von E_{260} und
 E_{472} charakterisiert und quantitativ erfaßt. Ergebnisse
siehe IV.3,3 (S.37 ff.).

A 5 Trennungen der Cooligomeren auf DEAE-Cellulose

Die DEAE-Cellulose wurde vor Gebrauch entsprechend der
Herstellerangabe gewaschen und äquilibriert. Für 100 OD₂₆₀
an nucleotidischem Material wurden jeweils 5-20ml DEAE-
Cellulose-Säulenvolumen eingesetzt. Bei den größeren Über-
schüssen konnte aber viel Material nicht zurückgewonnen
werden (ca. 20 %). Die Cooligomerenmischung wurde in Puffer
(eventuell Zugabe von etwas Pyridin) gelöst und in einer
Konzentration $< 0,01$ M (bezogen auf Nucleotid) in die Säule
eingewaschen. Es wurde solange mit Puffer niedriger Mola-
rität (30% Äthanol bzw. 30% DMF / 0,02M TBK) gewaschen, bis
alles Pyridin und eventuelle Reste an MMTrT eluiert worden
waren. Dann wurde ein Gradient von 30% Äthanol/0,02 M TBK zu
30% Äthanol/0,4 M TBK (jeweils ca. das 8-10fache des Säulen-
volumens) angelegt. Die UV-Extinktion (260nm) jeder Fraktion
(Ultrorac Fraktionensammler von LKB) wurde gemessen und
daraus das Elutionsdiagramm gezeichnet. Zusammengehörende
Fraktionen wurden vereinigt, das UV-Spektrum aufgenommen
(Referenz: Elutionspuffer) und das Verhältnis E_{260}/E_{472} be-
stimmt. Die vereinigten Fraktionen wurden unter mehrfacher
Zugabe von Pyridin einrotiert und als Pyridin-Stammlösung
bei -20°C aufbewahrt. Oder das Pyridin wurde unter Zugabe
von Äthanol abgezogen und der Rückstand aus Dioxan/ H_2O
lyophilisiert.

A 6 5'-Phosphorylierung von HO-TpdG^{ibu}pdG^{ibu}_{Ac}

Darstellung von β -Cyanoäthylphosphat-Pyridiniumsalz:

Das käufliche Ba-Salz des β -Cyanoäthylphosphats wurde nach TENER⁷⁰ mit Kationenaustauscher (DOWEX 50 in Pyridiniumform) in das Pyridiniumsalz überführt. Die resultierende H₂O/Pyridin-Lösung wurde unter stetiger Pyridinzugabe eingeeengt und absolutiert und als 1M Pyridin-Stammlösung zu Phosphorylierungsreaktionen eingesetzt. Es mußte darauf geachtet werden, daß beim Einengen der Pyridinlösung kein β -CEP ausfiel, da es sich sonst kaum wieder in Pyridin löste.

3'-Acetylierung von MMTrTpdG^{ibu}pdG^{ibu} :

Das Trimere wurde in Pyridin gelöst, absolutiert und nach WEBER u. KHORANA⁶⁴ mit Acetanhydrid (100facher Überschuß) umgesetzt. Nach Abbruch der Reaktion wurde mehrfach mit H₂O einrotiert und der Rückstand mit 80% Essigsäure zur Abspaltung der 5'-MMTr-Schutzgruppe ca. 50 min behandelt. Die Vollständigkeit der Abspaltung wurde auf einem Kieselgel-DC geprüft. Die Essigsäure wurde durch mehrmaliges Abrotieren mit H₂O entfernt, der Rückstand in wenig Puffer (0,05M TBK) gelöst und mit Äther das abgespaltene MMTrOH extrahiert. R_f des HO-TpdG^{ibu}pdG^{ibu}_{Ac} rel. zu pT in LM C = 0,78.

Zur Phosphorylierung mit β -CEP wurde die wässrige Phase mit Pyridin eingeeengt, und nach dem Absolutieren in Pyridin mit β -CEP-Stammlösung und dem Kondensationsmittel versetzt. Mengenangaben und Reaktionszeiten sind in Tab.10 Seite 58 enthalten, Kondensationsbedingungen und Abbruch der Reaktion wie unter A 2 (S.103) beschrieben. Dann wurde 3mal mit Essigester extrahiert, um einen Teil des Kondensationsmittels zu entfernen. Meist wurde dann eine alkalische Partialhydrolyse (wie in A 1, S.103 angegeben) angeschlossen. Das Pyridin wurde danach weitgehend einrotiert, und der Rückstand in 0,02M TBK-Puffer aufgenommen. Zur Kontrolle der Reaktion und zur Ausbeutebestimmung wurde eine Probe mit konz. Ammoniak-Lösung bei 60°C 5 h

behandelt (Abspaltung der N-Isobutyryl-Gruppen) und auf Papier in Laufmittel C getrennt (R_f rel. zu pT von d-pTpGpG = 0,43). Die Substanzflecke wurden eluiert und durch Extinktionsmessung die Ausbeute an 5'-phosphoryliertem Trimeren bestimmt.

Zur präparativen Trennung wurde DEAE-Cellulose verwendet. Die Säulentrennungen erfolgten wie unter A 5 beschrieben, nur daß der Elutionspuffer keinen oder nur 10% Äthanol (es wurde auch 30% Methanol verwendet) enthielt. Die Fraktionen wurden UV-spektroskopisch vermessen, und die entsprechend vereinigten Fraktionen mit Pyridin einrotiert, absolutiert und dann wie vorher beschrieben mit Acetanhydrid am 3'-Hydroxylende acetyliert. Nach Abbruch der Reaktion wurden die Proben mit Pyridin absolutiert und als Pyridin-Stammlösung zu Kondensationsreaktionen eingesetzt.

Bei der Phosphorylierung mit Mesitylensulfonyltriazolid (MST) als Kondensationsmittel wurde vor der DEAE-Cellulose-Trennung eine Gelfiltration auf Bio-Gel P-2 durchgeführt. Kondensationsmittel, Pyridin und überschüssiges Phosphat wurden dabei abgetrennt, so daß bei der DEAE-Cellulose-Trennung nur noch nichtphosphoryliertes und phosphoryliertes Trimeres eluiert wurden.

5'-Phosphorylierung mit POCl_3 :

Die Reaktion wurde ähnlich wie die von KÖSTER⁷¹ beschriebene durchgeführt. Ansatz: 240 OD₂₆₀ HO-TpdG^{ibu}pdG^{ibu}_{Ac} ($6 \cdot 10^{-3}$ mmol) wurden in Lutidin/ H_2O gelöst und 4mal mit Lutidin absolutiert. Dann wurde einrotiert und bei -10°C unter Rühren (Magnetrührer) in 0,3ml Petroläther/Äther (1:2) suspendiert, 0,1ml Lutidin zugesetzt und 20min mit 5 μl POCl_3 gerührt. Nach weiteren 30min bei Raumtemperatur wurde bei 0°C mit 0,3ml 0,2M TBK abgebrochen. Eine Probe der wässrigen Phase wurde einrotiert, mit konz. Ammoniak bei 50°C 5 h behandelt und auf Papier in Laufmittel C getrennt. Ausbeute an phosphoryliertem Trimeren = 54% . Die Hauptmenge des Ansatzes wurde mehrmals mit Pyridin einrotiert, in Puffer gelöst und auf eine DEAE-Cellulose-Säule (15ml) gegeben. Die Trennung erfolgte mit einem Gradienten von 150ml 40% Methanol/0,02M TBK und 150ml 40% MeOH/0,4M TBK.

A 7 Abspaltung der Schutzgruppen

Abspaltung der Basen-Schutzgruppen (N-Isobutyryl-):

Die Lösung eines Oligonucleotides wurde einrotiert und mit konz. Ammoniak-Lösung 48 h bei Raumtemperatur oder 5 h bei 50°C behandelt. Nach dem Abziehen des Ammoniaks wurde auf Papier (Laufmittel C) oder über eine Bio-Gel P-2 Säule getrennt. Daten siehe Tab.7 auf S.49 .

Abspaltung der 5'-MMTr-Gruppe:

Die Oligonucleotid-Lösung wurde einrotiert und mit 80% Essigsäure 40-60 min behandelt. Nach dem Abziehen der Essigsäure wurde der Rückstand in wenig Puffer (oder stark verdünntem Ammoniak) aufgenommen und auf Papier (Laufmittel C) oder über Bio-Gel P-2 gereinigt. Daten siehe Tab.8 S.50 .

A 8 Spaltung der Oligonucleotide mit Schlangengift-Phosphodiesterase

2-5 OD₂₆₀ des ungeschützten Oligonucleotids in 0,05 ml H₂O wurden mit 0,05 ml 0,2M Tris-Puffer (pH 8-9) gemischt und mit 0,01 ml Enzymlösung versetzt (Schlangengift-Phosphodiesterase von Merck, 1 mg /ml Glycerin ; 5 U/mg). Es wurde 7-12 h bei 37°C inkubiert und dann auf Papier in LM C getrennt (mit Referenzsubstanzen T, pT u. pdG). Die Substanzflecken wurden mit 0,02 N HCl eluiert und durch ein UV-Spektrum quantitativ bestimmt (als Referenzlösung wurde das Eluat eines Blindflecks eingesetzt). Folgende Extinktionskoeffizienten bei pH 2 wurden verwendet:

für T : $\epsilon_{267} = 9600$ u. für pdG : $\epsilon_{255} = 12200$.

Ein Test der Phosphodiesterase mit 4-Nitrophenylphosphat zeigte keinen Hinweis auf eine Phosphatase-Aktivität. Ergebnisse siehe Tab.9 S.51 . Bei der Spaltung von d-pTpGpG wurde gefunden: pT : pdG = 1 : 1,9 (theor.: 1:2) .

A 9 Versuche zur Überführung geschützter Diester-Oligonucleotide in Triesterderivate

Umsetzung mit DCC: Eine Pyridinlösung von MMTrT(pdG^{ibu})_n (30 OD₄₇₂ = $5 \cdot 10^{-4}$ mmol) wurde absolutiert und DCC (10^{-2} mmol)

zugegeben. Nach 20 h sowie nach 5 d wurden Proben direkt auf ein Kieselgel-DC aufgetragen und in Essigester chromatografiert. Außer auf dem Fleck am Start konnten mit 10% HClO_4 unter Erwärmen keine MMTr-haltigen Substanzen nachgewiesen werden.

Versuche zur Veresterung der Phosphodiesterbindungen mit Hydroxy-propionitril:

Eine absolutierte Pyridinlösung von $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_n$ ($33 \text{ OD}_{472} = 6 \cdot 10^{-4} \text{ mmol}$) wurde mit 5 μl Hydroxypropionitril ($4 \cdot 10^{-2} \text{ mmol}$) und 20 mg TPS ($6,5 \cdot 10^{-2} \text{ mmol}$) 12 h behandelt. Nach Abbruch der Reaktion (siehe A 2) wurde eingeeengt, in etwas Äthanol/ H_2O /Pyridin aufgenommen und auf einem Kieselgel-DC in Essigester chromatografiert. Außer am Start war keine MMTr-haltige Substanz nachzuweisen.

A 10 Testkondensation von MMTrT u. $\text{pdG}^{\text{ibu}}_{\text{Ibu}}$ mit MStE

Zur Darstellung von MStE siehe bei B 1. MMTrT ($3 \cdot 10^{-2} \text{ mmol}$) und $\text{pdG}^{\text{ibu}}_{\text{Ibu}}$ ($3 \cdot 10^{-2} \text{ mmol}$) wurden in Pyridin absolutiert, in 4 ml gelöst und mit 23 mg MStE ($9 \cdot 10^{-2} \text{ mmol}$) kondensiert. Nach 0,5, 1,5, 3, 10 und 20 h wurden jeweils 0,05 ml der Lösung entnommen und mit 0,05 ml Pyridin/ H_2O abgebrochen (6 h). Von diesen Lösungen wurden jeweils ca. 0,02 ml in einem 3cm breiten Streifen auf eine Kieselgel-Dünnschichtfolie aufgetragen und in Essigester chromatografiert. Als Referenzsubstanzen wurden MMTrT und MMTr-OH aufgetragen. Nach der Chromatografie wurden die Flecke von MMTrT und dem Produkt $\text{MMTrTpdG}^{\text{ibu}}_{\text{Ibu}}$ im UV-Licht markiert, ausgeschnitten, das Kieselgel von der Folie gekratzt und 30 min mit 70% HClO_4 (5ml) geschüttelt. Nach kurzem Zentrifugieren wurde im Überstand die Extinktion bei 472nm gemessen. Aus dem Extinktionsverhältnis $\text{MMTrT}:\text{MMTrTpdG}^{\text{ibu}}_{\text{Ibu}}$ konnte direkt der Umsatz bei der Kondensation erhalten werden. Ergebnisse siehe Abb.21 auf S.65.

A 11 ^3H -Austausch bei dG-haltigen Oligonucleotiden

Die Austauschreaktionen wurden in einer luftdichten Kammer (glove box) im Isotopenlabor durchgeführt. Die Apparatur

zu dieser Reaktion ist in Abb.23 auf S.70 dargestellt. Eine wässrige Lösung des ungeschützten Oligonucleotides (bei Testversuchen: 10-15 OD₂₆₀, bei der Blockkondensation 6.6./S.71: 80 OD₂₆₀) wurde im Reaktionsgefäß (3 ml-Schliffreagenzglas) lyophilisiert und mit soviel 1 N NaOH versetzt, daß in der Austauschreaktion eine 0,1 N NaOH-Lösung resultierte. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß in die glove box eingebracht, 0,025 bzw. 0,1 ml der ³H₂O/H₂O-Mischung (25 mCi/ml) zugegeben, an die Apparatur angehängt und bei geschlossenen Hähnen 3-3,5 h bei 60°C gehalten. Dann wurde die Reaktionslösung eingefroren und durch Einschalten der Vakuumpumpe lyophilisiert. Die Apparatur wurde zwischen Reaktionsgefäß und Kulfalle mit einem Fön erhitzt, um eventuell kondensiertes ³H₂O auch noch in die Kulfalle zu verdampfen. Nach Schließen der Hähne zur Kulfalle und zur Pumpe wurde über das Trockenrohr belüftet, mit der entsprechenden Menge 0,1 N Essigsäure neutralisiert und nach Zugabe von 0,5 ml H₂O nochmals lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 0,5 ml H₂O gelöst und ein Aliquot davon im Szintillationszähler vermessen. Ergebnisse siehe Tab.11 S.70 und Abschnitt 6.6 auf S.71.

A 12 Testkondensationen von pTpdG^{ibu}pdG^{ibu}_{Ac} mit MMTrT

Eine Pyridinlösung von MMTrT (20 OD₂₆₀ = ca. $2 \cdot 10^{-3}$ mmol) und pTpdG^{ibu}pdG^{ibu}_{Ac} (80 OD₂₆₀ = ca. $4 \cdot 10^{-3}$ mmol) wurde 3mal mit Pyridin absolutiert, auf ein Volumen von ca. 0,2 ml eingeeengt und mit MStE (4 mg = $1,5 \cdot 10^{-2}$ mmol) 20 h behandelt. Der Abbruch erfolgte wie unter A 2 beschrieben. Eine Probe wurde auf einem Kieselgel-DC in Essigester chromatografiert, außer MMTrT war jedoch kein anderer Substanzfleck mit HClO₄ anzufärben. Ein Kieselgel-DC einer Probe, bei der das MMTrT mit Essigester extrahiert worden war, konnte an keiner Stelle mit HClO₄ angefärbt werden.

Eine Kondensation mit einem Überschuß an MMTrT (2fach bezogen auf $2 \cdot 10^{-3}$ mmol pTpdG^{ibu}pdG^{ibu}_{Ac}) zeigte kein anderes Ergebnis. Versuche mit dem Kondensationsmittel MS verliefen gleichfalls negativ.

A 13 Blockkondensationsversuche am Beispiel der Kondensation von $\text{MMTrTp dG}^{\text{ibu}}_{\text{pdG}^{\text{ibu}}_{\text{pdG}^{\text{ibu}}}}$ mit $\text{pTp dG}^{\text{ibu}}_{\text{pdG}^{\text{ibu}}_{\text{Ac}}}$ mit anschließendem ^3H -Austausch

$\text{MMTrTp dG}^{\text{ibu}}_{\text{pdG}^{\text{ibu}}_{\text{pdG}^{\text{ibu}}}}$ (70 OD_{260} = ca. $1,2 \cdot 10^{-3}$ mmol) und $\text{pTp dG}^{\text{ibu}}_{\text{pdG}^{\text{ibu}}_{\text{Ac}}}$ (200 OD_{260} = ca. $4,8 \cdot 10^{-3}$ mmol) wurden 3mal absolutiert, auf 0,5 ml eingeeengt und mit 3,8 mg MSTe (ca. $1,5 \cdot 10^{-2}$ mmol) 24 h kondensiert. Abbruch wie unter A 2 beschrieben. Der Ansatz wurde dann geteilt. Eine Hälfte wurde ohne vorherige Schutzgruppenabspaltungen über eine Tritylcellulose-Säule (1,2 x 9 cm) getrennt: In der 70% Fraktion waren enthalten 29,6 OD_{472} bzw. 31 OD_{260} (E_{260}/E_{472} = 1,04, entspricht $\text{MMTrT}(\text{pdG}^{\text{ibu}})_3$), in der 30% Äthanol-Fraktion waren weniger als 1 OD_{472} . Nach der Schutzgruppenabspaltung konnte auf einem PEI-Cellulose-DC in LM G bei 60°C 38 nur das Tetramere gefunden werden.

Bei der anderen Hälfte des Kondensationsansatzes wurden die Schutzgruppen abgespalten und über eine Bio-Gel P-2 Säule von Schutzgruppen, Kondensationsmittel und Pyridin abgetrennt. Es resultierten 82 OD_{260} ($\lambda_{\text{max}} = 254\text{nm}$, $\lambda_{\text{min}} = 227\text{nm}$ $E_{260}/E_{280} = 1,62$ bei pH 7,5). Die Lösung wurde lyophilisiert und wie in A 12 beschrieben mit $^3\text{H}_2\text{O}$ ausgetauscht. Nach der Reaktion wurde lyophilisiert, der Rückstand in 1 ml H_2O gelöst und 0,4 ml auf eine Bio-Gel P-30 Säule (2x30cm; V_0 für Dextranblau = 17,5 ml) gegeben. Es wurde mit 0,2 M NH_4HCO_3 eluiert: Peak I (17-22ml Elutionsmittel) und Peak II (45-70ml Elutionsmittel). Die beiden Fraktionen wurden einrotiert, lyophilisiert und in jeweils 0,2 ml H_2O gelöst (I = 4,7 OD_{260} ; II = 22 OD_{260}). Von Lösung I wurden 0,1 ml und von Lösung II 0,05 ml auf PEI-Cellulose-Folie zusammen mit d-pTGG und d-TGGG als Referenzen aufgetragen und in Laufmittel G bei 60°C chromatografiert. Unter UV-Licht war bei I nur Tetrameres zu sehen, bei II d-pTGG und d-TGGG. Das Chromatogramm von I wurde in 0,5 cm breite Streifen geschnitten, und die Streifen mit 0,5 ml 0,5 M NH_4HCO_3 geschüttelt. Nach kurzem Zentrifugieren wurden jeweils 0,2 ml im Szintillationszähler gemessen. Praktisch die gesamte Aktivität war auf dem Fleck ($\pm 0,5\text{cm}$) des Tetrameren enthalten.

B Oligonucleotid-Synthese nach dem Triesterverfahren

B 1 Synthese der Ausgangsprodukte

Mesitylensulfonyltetrazolid (MSTe) wurde nach einer Vorschrift von NARANG et al.³⁸ durch Umsetzung von MS (vorher unkristallisiert in Pentan) mit Tetrazol (durch Lyophilisation von zugesetztem H_2O befreit) in absolutem Dioxan mit Triäthylamin als HCl-Abfänger hergestellt. Es wurde aus Benzol unkristallisiert; Ausbeuten 45-55%. NMR-Spektrum: 3 H (Singulett 2,34ppm), 6 H (S 2,68ppm), 2 H (S 7,1ppm), 1 H (S 9,17ppm).

p-Chlorphenylphosphorsäuredichlorid wurde nach CRAMER u. WINTER⁹⁴ durch Reaktion von p-Chlorphenol mit einem 3fachen Überschuß an $POCl_3$ gewonnen (4 Tage unter Rückfluß, Zusatz einer katalytischen Menge von NaCl). Im Wasserstrahlpumpenvakuum wurde $POCl_3$ abgezogen und dann im Ölpumpenvakuum das Produkt destilliert (92°C bei 0,5 Torr).

Das bifunktionelle Phosphorylierungsmittel p-Chlorphenylphosphorsäureditriazolid ($p-ClPhT_2$) wurde entsprechend der Vorschrift von NARANG⁹⁹ hergestellt und als Dioxanlösung bekannter Konzentration zur Nachphosphorylierung eingesetzt.

Das monofunktionelle Phosphorylierungsmittel p-Chlorphenyl- β -cyanoäthyl-phosphorsäurechlorid wurde analog einer Synthesevorschrift von v. BOOM et al.⁹⁵ (für o-Chlorphenyl-trichloräthyl-phosphorsäurechlorid) dargestellt: Zu einer Lösung von 24,5 g p-Chlorphenylphosphorsäuredichlorid (0,1 mmol) und 7,1 g frisch destilliertem 3-Hydroxypropionitril (0,1 mmol) in 150 ml absolutem Äther wurde unter Kühlen (Eisbad) und Rühren langsam eine Lösung von 10,1 g Triäthylamin (0,1 mmol) in 10 ml Äther zugetropft. Danach wurde 2 h unter Rühren bei Raumtemperatur weiterreagieren lassen, vom ausgefallenen Triäthylammoniumchlorid abfiltriert, und im Wasserstrahlvakuum der Äther vollständig aus dem Filtrat abgezogen. Das Produkt ließ sich im Hochvakuum destillieren; Siedepunkt:

160°C bei 0,06 Torr. Im allg. konnte das Produkt undestilliert zu Phosphorylierungsreaktionen eingesetzt werden, da die Ausbeute nahezu quantitativ war.

Synthese von 5'-Monomethoxytritylthymidin-3'-p-chlorphenyl- β -cyanoäthylphosphat:

5'-MMTrT wurde nach Schaller et al.⁹¹ hergestellt (vergl. A 1 auf S.102) und über eine Kieselgel-short-column-Chromatografie gereinigt (Säule 3x10 cm, mit CHCl_3 /4% MeOH eluiert, Kieselgel 60 0,06-0,2 mm von Merck); Ausbeute bei 10 mmol dT : 85%.

5'-MMTrT (1,53 g = 3 mmol) wurden in 20 ml absolutem Acetonitril gelöst und zur Entfernung von Wasserspuren mehrmals mit Acetonitril absolutiert. Es wurde dann auf ein Volumen von ca. 20 ml mit abs. Acetonitril aufgefüllt, 1,2 ml N-Methylimidazol (15 mmol) zugegeben und unter Kühlen (Eisbad) und Rühren langsam eine Lösung von 2,2 g p-Chlorphenyl- β -cyanoäthylphosphorsäurechlorid (8 mmol) in 5 ml absolutem Acetonitril zugetropft. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur 2 h gerührt, und dann bei 0°C mit 10 ml 1M NH_4HCO_3 (langsam zugetropft) die Reaktion abgebrochen. Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur wurde der Ansatz vorsichtig (NH_4HCO_3 spritzt stark) einrotiert, in 50 ml CHCl_3 aufgenommen und 3mal mit ca. 30 ml 0,1 M NH_4HCO_3 extrahiert, zum Schluß 1mal mit 20 ml H_2O . Die CHCl_3 -Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und einrotiert. Der Rückstand wurde in ca. 2 ml CHCl_3 gelöst und über eine Kieselgel-short-column-Chromatografie getrennt (Säule 3x8 cm, Kieselgel 60 Merck 7734). Der 5'-MMTrT-Triester wurde mit CHCl_3 /2% MeOH eluiert, nicht-umgesetztes 5'-MMTrT wurde mit CHCl_3 /5% MeOH eluiert. Ausbeute an 5'-MMTrT-Triester: 132400 OD₄₇₂=2,4 mmol=80,2%. Daten: λ_{max} =266nm, λ_{min} =248, E_{260}/E_{280} = 1,64, E_{280}/E_{472} =0,11 (ber. 0,12), R_f auf Kieselgel in LM E = 0,58 und in LM F = 0,75.

Die Lösung wurde einrotiert, in CHCl_3 aufgenommen und der 5'-MMTrT-Triester als CHCl_3 -Stammlösung bei -20 0°C aufbewahrt.

Synthese von 5'-Monomethoxytrityl-N²-isobutyryldesoxyguanosin-3'-p-chlorphenyl-β-cyanoäthylphosphat:

Zur Synthese dieses monomeren Triesters wurde zunächst N²-Isobutyryldesoxyguanosin nach folgender Vorschrift (Abwandlung der Literaturvorschriften von NARANG et al.³⁸ und von BÜCHI u. KHORANA⁹³) hergestellt:

1,34 g (5 mmol) Desoxyguanosin wurden in ca. 20 ml einer Dioxan/Wasser-Mischung (2:1) suspendiert und lyophilisiert. Das so vorgetrocknete Desoxyguanosin wurde 2mal mit je 5 ml absolutem Pyridin bis zur Trockne eingengt und in einer Mischung aus 30 ml CHCl₃ und 4 ml Pyridin suspendiert. In diese Suspension wurde unter Kühlen und Rühren langsam 4 ml Isobuttersäurechlorid (40 mmol) eingetropft. Nach etwa 60 min bei Raumtemperatur war eine klare Lösung entstanden. Es wurde noch weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt und dann unter Eiskühlung mit 10 ml H₂O abgebrochen. Ein Kieselgel-DC in LM F zeigte nur einen Fleck (N²,O^{3'},O^{5'}-Triisobutyryldesoxyguanosin). Die CHCl₃-Phase wurde abgetrennt, noch 2mal mit je 10 ml H₂O gewaschen und dann vollständig einrotiert. Der zähe Rückstand wurde in 20 ml Äthanol aufgenommen und bei 0°C mit 20 ml 2 N NaOH 15 min unter Rühren hydrolysiert. Es wurde mit 40 ml DOWEX-Kationenaustauscher (Pyridiniumform) neutralisiert. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert und gründlich gewaschen (1mal mit 100 ml Methanol/Pyridin, 3 mal mit je 100 ml MeOH/Wasser (ca. 2:1)). Das Filtrat und die Waschlösungen wurden vereinigt und bis zur Trockne einrotiert. Es wurde nochmals mit wenig Äthanol einrotiert, um das Pyridin weitgehend zu entfernen. Der Rückstand wurde in möglichst wenig heißem Wasser gelöst, aus dem beim Abkühlen das N²-Isobutyryldesoxyguanosin ausfiel. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit wenig Eiswasser gewaschen und aus Dioxan/H₂O lyophilisiert. Das Filtrat der ersten Fällung wurde nochmals eingengt, erhitzt, abgekühlt, und der Niederschlag abgetrennt. Insgesamt wurden 1,35 g N²-Isobutyryldesoxyguanosin erhalten = 80 % Ausbeute. R_f auf Kieselgel-DC in LM E=0,05 und

in LM F = 0,24 . UV-Daten in Methanol: $\lambda_{\max}$ bei 280nm und bei 260-254nm , $\lambda_{\min}$ bei 272nm und bei 228 nm , $E_{260}/E_{280} = 1,36$.

5'-Monomethoxytrityl-N²-isobutyryldesoxyguanosin wurde nach BÜCHI u. KHORANA⁹³ durch Umsetzung von dG^{ibu} mit einem 1,2fachen Überschuß an MMTr-Cl hergestellt und über eine Kieselgel-Säule gereinigt (Säule 3x8 cm , Kieselgel Merck 7734 , MMTrdG^{ibu} mit CHCl₃/ 7% MeOH eluiert). Ausbeute 80% ; UV-Daten: $\lambda_{\max}$ bei 280nm und bei 254-260nm , $\lambda_{\min}$ bei 272nm und bei 236nm , $E_{260}/E_{280} = 1,33$, $E_{280}/E_{472} = 0,23$ (ber.: 0,21) ; R_f auf Kieselgel-DC in LM E = 0,28 in LM F = 0,65 .

5'-Monomethoxytrityl-N²-isobutyryldesoxyguanosin-3'-p-chlorphenyl-β-cyanoäthylphosphat wurde in gleicher Weise hergestellt, wie für das 5'-Monomethoxytritylthymidin-3'-p-chlorphenyl-β-cyanoäthylphosphat auf S.115 angegeben wurde. Ein 5facher Überschuß an monofunktionellem Phosphorylierungsmittel mußte jedoch eingesetzt werden, um ebenfalls 75-80% Ausbeute zu erzielen. Die Aufreinigung erfolgte wieder über Kieselgel-short-column-Chromatografie , das Produkt wurde mit CHCl₃ /2-5% MeOH eluiert (vergl. Abb.27 S.82).

UV-Daten: $\lambda_{\max}$ bei 276nm und bei 254-260nm , $\lambda_{\min}$ bei 272nm und bei 234nm , $E_{260}/E_{280} = 1,37$, $E_{280}/E_{472} = 0,22$ (ber.: 0,21) . R_f auf Kieselgel-DC in LM E = 0,44 u. 0,38 (Diastereomere) und in LM F = 0,67 .

B 2 Abspaltung der 5'-MMTr-Schutzgruppe

Die Abspaltung erfolgte nach NARANG³⁸ mit einer 2% Benzolsulfonsäure-Lösung in CHCl₃/MeOH (7:3) bei 0°C innerhalb von 20-25 min (Kontrolle mit Kieselgel-DC). Die Benzolsulfonsäure wurde mit 5% NH₄HCO₃ (2mal) und H₂O (1mal) extrahiert, die CHCl₃-Phase getrocknet und einrotiert. Der Rückstand wurde in wenig CHCl₃ gelöst und über Kieselgel-short-column-Chromatografie getrennt, wie am Beispiel einer MMTr-Abspaltung an 5'-Monomethoxytrityl-N²-isobutyryldesoxyguanosin-p-chlorphenyl-β-cyanoäthylphosphat

erläutert werden soll. Voll geschützter dG-Triester (0,3 mmol) wurde mit 15 ml 2% Benzolsulfonsäure wie oben beschrieben behandelt und aufgearbeitet. Dann wurde auf eine Kieselgel-Säule (3 x 6 cm ; Kieselgel Merck 7733) gegeben, mit 150 ml CHCl_3 , das entstandene MMTr-OH ausgewaschen und mit 100 ml CHCl_3 /2% MeOH nachgewaschen. Anschließend wurde mit CHCl_3 /7% MeOH eluiert und fraktioniert ; die einzelnen Fraktionen - je 15 ml/15 min - wurden auf Kieselgel-DC's in LM E identifiziert. Das Produkt 5'-HO-N²-isobutyryldesoxyguanosin-3'-p-chlorphenyl- β -cyano-äthylphosphat wurde mit 350 ml CHCl_3 /7% MeOH eluiert:

4000 OD₂₆₀ = 0,24 mmol = 80% Ausbeute. UV-Daten und R_f-Werte siehe Tab.14 auf S.86 bei Monomer 2 .

Die Lösung wurde einrotiert und als CHCl_3 -Stammlösung bei -20°C aufbewahrt.

Bei Oligonucleotid-Triestern erfolgte die Abspaltung der 5'-MMTr-Gruppe auf dieselbe Weise, nur die Säulendimensionen mußten je nach Substanzmenge variiert werden (vergl. auch B 4). Bei richtiger Wahl der Säulengröße konnte der 5'-HO-Oligonucleotid-Triester zu 90-95 % zurückgewonnen werden.

B 3 Kondensationen zur Darstellung von Triester-Oligonucleotiden

Angaben über eingesetzte Mengen und Ausbeuten in den einzelnen Kondensationsreaktionen sind in Tab.13 auf S.85 enthalten.

Zur Abspaltung der β -Cyanoäthylgruppe wurde die benötigte Menge des geschützten Triesters (Oligomer- oder Monomer-) aus der CHCl_3 -Stammlösung einrotiert, mit Pyridin absolutiert, in wenig abs. Pyridin gelöst und nach SOOD und NARANG⁹⁶ mit einem 50-100fachen Überschuß an Triäthylamin behandelt. Nach 2-5 h war die β -Cyanoäthylgruppe quantitativ abgespalten worden, wie durch ein DC in LM E geprüft wurde. Überschüssiges Triäthylamin und gebildetes Acrylnitril wurden im Vakuum abgezogen, der Rückstand in wenig

abs. Pyridin gelöst, und eine Pyridinlösung der 5'-Hydroxylkomponente (meist im Unterschuß) zugegeben. Die Mischung wurde auf ein Volumen von ca 5 ml/0,5 mmol Nucleotid eingengt, über ein P_2O_5 -Trockenrohr belüftet und das Kondensationsmittel MSTe (3-5 molarer Überschuß pro Diesterkomponente) zugegeben. Dann wurde nochmals etwas Pyridin abgezogen und 1,5-4 h kondensiert. Der Umsatz wurde nach 1,5 h erstmals kontrolliert (DC in LM E).

Bei vollständigem Umsatz der Hydroxylkomponente oder bei großem Unterschied im R_f -Wert zwischen Hydroxylkomponente und Produkt wurde die Reaktion anschließend bei $0^\circ C$ mit 5% NH_4HCO_3 -Lösung (gleiches Volumen wie Kondensationsansatz) abgebrochen. Weitere Aufarbeitung siehe unten.

Bei unvollständigem Umsatz der Hydroxylkomponente und geringem Unterschied im R_f -Wert mußte die 5'-Hydroxylkomponente phosphoryliert werden (vergl. S.81). Dazu wurde zum Kondensationsansatz (kein Abbruch!) ein 1,5-2facher Überschuß (bezogen auf die Hydroxylkomponente) an p-Chlorphenyl-phosphorsäureditriazolid ($p-ClPhT_2$) als Dioxanlösung (Darstellung siehe unter B 1) zugegeben und 30-50 min reagieren gelassen; die Vollständigkeit der Phosphorylierung wurde dünnschichtchromatografisch kontrolliert.

Dann wurde wie oben beschrieben mit 5% NH_4HCO_3 bei $0^\circ C$ die Reaktion abgebrochen und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Ansatz wurde 3mal mit $CHCl_3$ (gleiches Volumen wie die Reaktionslösung) extrahiert. Die vereinigten $CHCl_3$ -Phasen wurden 2mal mit 0,1 N NH_4HCO_3 und 1mal mit H_2O gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert. Durch mehrmaliges Einrotieren mit Toluol und Äthanol wurde das Pyridin aus der Lösung entfernt, und anschließend der Rückstand in wenig $CHCl_3$ aufgenommen.

B 4 Kieselgel-short-column-Trennungen der Kondensationsprodukte

Bei den relativ kleinen Mengen, die zu Kondensationen eingesetzt wurden, war es günstiger, das grobkörnigere Kieselgel von Macherey&Nagel bzw. das von Merck (7733) für die

Trennungen zu verwenden. Folgende Säulendimensionen haben sich im Verlauf der Arbeit als günstig erwiesen:

Für ca. 1 mmol nucleot. Material : 2 x 6 cm = 10 ml
 Für ca. 0,1 " " " : 1,2 x 7 cm = 7 ml
 Für ca. 0,01 " " " : 0,8 x 5 cm = 2,5 ml

Die aufgearbeiteten Kondensationsprodukte (siehe B 3) wurden in wenig CHCl_3 gelöst auf die Säule gegeben und mit CHCl_3 Reste von Pyridin und Kondensationsmittel aus der Säule gewaschen. Dann wurde mit einem Stufengradienten von CHCl_3 / x % MeOH eluiert (x = 2% , 4% , 5% , 6% , 7% , 8% und 10%). Es wurde eine Durchflußgeschwindigkeit von 30-50 ml/h einreguliert und Fraktionen à 10-15 ml auffangen. Diese Fraktionen wurden parallel zur Trennung auf Kieselgel-DC's untersucht und identifiziert. Der Methanolgehalt des Elutionsmittels wurde erst erhöht, wenn keine oder nur noch sehr wenig Substanz eluiert wurde.

Zusammengehörende Fraktionen wurden vereinigt und durch ein UV-Spektrum charakterisiert und quantitativ erfaßt. Zur Extinktionsbestimmung bei 472nm wurde ein Aliquot der Lösung mit 70% HClO_4 /Äthanol (9:1) auf ein bekanntes Volumen verdünnt und im Spektrophotometer gemessen. Die Produktfraktion wurde einrotiert und in einem definierten Volumen CHCl_3 gelöst bei -20°C aufbewahrt. Die UV-Daten und R_f -Werte der synthetisierten geschützten Oligonucleotid-Triester sind in Tab.14 auf S.86 angegeben.

Daten zu durchgeführten Kieselgel-Säulentrennungen:

Produkt: Nr. v. Abb.28 S.84	Säule	Kieselgel Merck Nr.	mit % MeOH eluiert	Aus- beute
Dimer <u>3</u>	2 x 6 cm	7734	4	90%
Dimer <u>4</u> (100µmol)	1,2 x 7,5 cm	7733	5-6	
Dimer <u>6</u>	2 x 6 cm	7733	3	
Trimer <u>8</u>	1,2 x 7,5 cm	7734	4	58%
Trimer <u>9</u> (45µmol)	2 x 6	7733	6-7	
Tetramer <u>10</u>	0,8 x 8,2	7734	5-6	
Heptamer <u>11</u>	2 x 6	7733	6-8	

B 5 Synthese des Octanucleotides d-TGGGTGGT

Das zu dieser Synthese benötigte 3'-O-Acetyl-thymidin wurde durch 3'-Acetylierung von 5'-MMTrT (0,3mmol) und anschließender Abspaltung der 5'-MMTr-Gruppe mit 80% Essigsäure hergestellt. Die Aufreinigung erfolgte über eine Kieselgelsäule (1,5 x 6 cm; Kieselgel Merck 7733). Das Produkt wurde mit $\text{CHCl}_3/8\% \text{ MeOH}$ eluiert: $1380 \text{ OD}_{260} = 1,55 \text{ mmol} = 52\% \text{ Ausbeute}$. UV-Daten: $\lambda_{\text{max}} = 266 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{min}} = 233 \text{ nm}$ $E_{260}/E_{280} = 1,69$. R_f in LM E = 0,31 u. in LM F = 0,6.

Zur Kondensationsreaktion wurden $2,5 \mu\text{mol}$ geschütztes Heptamer mit $180 \mu\text{mol}$ Triäthylamin in den Diester überführt, und mit $12 \mu\text{mol}$ 3'-Acetylthymidin und $25 \mu\text{mol}$ MStE 5 h kondensiert. Nach Abbruch der Reaktion und entsprechender Aufarbeitung wurde über eine Kieselgelsäule getrennt (2 x 5 cm; Kieselgel Merck 7733). Mit 3,5% MeOH-Gehalt wurde das überschüssige 3'-Acetylthymidin eluiert und mit 8-10% MeOH-Gehalt das Octamere. Ausbeute $55 \text{ OD}_{472} = 1,0 \mu\text{mol} = 41\%$. UV-Daten: $\lambda_{\text{max}} = 257-261 \text{ nm}$, $E_{280}/E_{472} = 1,8$ (ber.: 1,4). Die Säule war zu groß dimensioniert für diesen Ansatz, so daß ein Teil des Produktes nicht von der Säule eluiert werden konnte. Mit einem MeOH-Gehalt über 10% wurde bereits ein Teil des Dimeren miteluiert.

R_f des vollgeschützten Octanucleotid-Triester in LM E = 0,33.

Zur Schutzgruppenabspaltung wurden ca. 30 OD_{260} des geschützten Octameren mit Benzolsulfonsäure behandelt. Nach der Extraktion der Benzolsulfonsäure mit 5% NH_4HCO_3 wurde die CHCl_3 -Phase einrotiert und der Rückstand mit konz. Ammoniak bei 50°C 5 h behandelt. Der Ammoniak wurde durch zweimaliges Einrotieren mit H_2O entfernt, der Rückstand in H_2O gelöst (5ml) und 2 mal mit je 5 ml Äther extrahiert. Dann wurde die H_2O -Phase in 1 ml stark verd. Ammoniak-Lösung und 0,2 ml Pyridin gelöst.

Zur Abtrennung kurzkettiger Fragmente, die bei der NH_3 -Behandlung entstehen, wurde diese Lösung auf eine Sephadex G-75 Säule (1x60 cm=45 ml; V_0 für Dextranblau =18 ml)

gegeben. Es wurde mit NH_3 -haltigem H_2O (4 Tropfen konz. NH_3 auf 500 ml H_2O , pH=8,5) eluiert. Nach 19 ml wurden 15 OD_{260} in einem Peak von 14 ml eluiert und nach insgesamt 37 ml ein zweiter Peak mit 10,8 OD_{260} . Beide Fraktionen zeigten ein nucleotidisches UV-Spektrum; die erste Fraktion war aber deutlich sauberer ($\lambda_{\text{max}}=255\text{nm}$, $\lambda_{\text{min}}=231\text{nm}$, pH 8,5).

Zur Auftrennung nach Kettenlänge wurden ca. 5 OD_{260} der ersten Fraktion von der Sephadex G-75 Trennung auf eine gewaschene (vergl. S.101) PEI-Cellulose-Folie (10x20 cm, Höhe:20) in einem 4 cm breiten Streifen aufgetragen.

Als Referenzen wurden blauer (Xylenecyanol FF) und gelber (Methylorange) Farbmarker aufgetragen. Die Folie wurde bei 60°C in Laufmittel G solange entwickelt, bis der blaue Marker ca. 3 cm vom oberen Rand entfernt war³⁸.

Die Platte wurde mit Methanol gewaschen und im UV-Licht die Substanzbanden markiert. Es resultierten mehrere UV-absorbierende Banden. Die Bande, die am tiefsten lief (R_f rel. zum gelben Marker = 1,2), wurde ausgeschnitten und mit 10 ml 2 N NH_4HCO_3 eluiert. Das Eluat wurde mehrmals mit H_2O einrotiert und dann aus wenig H_2O lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde dann in 0,3 ml stark verdünnter Ammoniak-Lösung aufgenommen und über eine kleine Bio-Gel P-2 Säule aufgereinigt (0,6 x 40 cm, V_0 für Dextranblau = 6 ml). Es wurden 0,45 OD_{260} eluiert mit $\lambda_{\text{max}}=255\text{ nm}$, $\lambda_{\text{min}}=234\text{nm}$ (pH 8,0); ca 80-90% Verlust beim Aufarbeiten von der PEI-Cellulose.

B 6 Enzymatische Spaltung des Octameren d-TGGGTGGT mit Schlangengift-Phosphodiesterase

Ca. 0,1 OD_{260} von obiger Lösung des ungeschützten Octameren wurde lyophilisiert (in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 ml Volumen) und mit 5 μl Schlangengift-Phosphodiesterase-Lösung in 25 μl Puffer (vergl. A 8 auf S. 110) bei 37°C 12 h inkubiert. Anschließend wurde mit 50 μl Puffer verdünnt, etwas Sepharose-Con A (Pharmacia) zugesetzt, geschüttelt und abzentrifugiert.

Die überstehende Lösung wurde direkt in die HPLC-Anlage eingespritzt. Die Auftrennung der Hydrolyse-Produkte ist in Abb.30 auf S.91 dargestellt.

Die Ermittlung der relativen Molanteile der Spaltprodukte erfolgte durch Ausschneiden und Auswägen der Peakflächen und Division der gemessenen Gewichte durch den jeweiligen Extinktionskoeffizienten.

Es wurden folgende ϵ_{254} -Werte nach TRIP u. SMITH ¹¹¹ verwendet: pT : $\epsilon_{254}=6820$ und pdG: $\epsilon_{254}=13290$ bei pH 4,5.

Die gemessenen Gewichte und daraus ermittelten Molanteile sind nachfolgend angegeben:

Nucleosid , Nucleotid	Peakfläche in g	rel. Mol- Anteile	Mol rel. zu T
T	0,02825	$4,14 \cdot 10^{-6}$	1
pT	0,05715	$8,38 \cdot 10^{-6}$	2,1
pdG	0,25673	$1,93 \cdot 10^{-5}$	4,7

VIII. Literaturverzeichnis

- 1 IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature , Eur.J.Biochem. 15,203 (1970)
- 2 F.MIESCHER, Hoppe-Seylers med.-chem. Unters. 4, 441 (1871)
- 3 O.T.AVERY, C.M.MCLEOAD a. M.McCARTY, J.Exptl.Med. 79, 137 (1944)
- 4 G.W.BEADLE a. E.L.TATUM, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 499, 27 (1941)
- 5 J.D.WATSON a. F.H.C.CRICK, Nature 171, 737 (1953)
- 6 M.NIERENBERG a. J.H.MATTHAEI , Proc.Natl.Acad.Sci. 47, 1588 (1961)
- 7 H.G.KHORANA, Angew.Chem. 81, 1027 (1969)
- 8 R.W.HOLLEY et al. SCIENCE 147,1462 (1965)
- 9 W.FIERS, Med.i.u.Z. 1,10 (1977)
- 10 F.SANGER a. A.R.COULSON, J.Mol.Biol. 94, 441 (1975)
- 11 A.M.MAXAM a. W.GILBERT, Proc.Nat.Acad.Sci. 74, 560 (1977)
- 12 R.D.WELLS, E.OHTSUKA a. H.G.KHORANA, J.Mol.Biol. 14, 221 (1965)
- 13 F.SANGER, J.E.DONELSON, A.R.COULSON, H.KÖSSEL a. D.FISCHER, J.Mol.Biol. 90, 315 (1974)
- 14 z.B.: A.EFSTRATIADIS, F.C.KAFATOS, A.M.MAXAM, T.MANIATIS, Cell 7, 279 (1976)
- 15 R.PADMANABHAN, Biochem. 16, 1996 (1977)
- 16 C.R.ASTELL, M.SMITH, Biochem. 11, 4114 (1972)
- 17 P.CASHION, H.NOTMANN, G.SATHE, K.PORTER a. E.JAY, Nucleic Acids Res. 4, 2593 (1977)
- 18 C.P.BAHL, K.J.MARIANS a.R.WU, J.STAWINSKY a. S.A.NARANG, Gene 1, 81 (1976)
- 19 M.S.POONIAN, W.W.McCOMAS a. A.L.NUSSBAUM, Gene 1, 357 (1977)
- 20 K.AGARWAL,H.BÜCHI,H.G.KHORANA et al. , J.Mol.Biol. 72, 209 (1972)
- 21 H.G.KHORANA et al., J.Biol.Chem. 251, 565 (1976)
- 22 D.V.GOEDDEL, D.G.YANSURA a. M.H.CARUTHERS Nucleic Acids Res. 4, 3039 (1977)

- 23 C.P.BAHL, R.WU, K.ITAKURA, N.KATAGIRI a.
S.A.NARANG, Proc.Nat.Acad.Sci. 73, 91 (1976)
- 24 H.KÖSTER, H.BLÖCKER, R.FRANK, S.GEUSSENHAINER
u. W.KAISER, Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem.
356, 1585 (1975)
- 25 K.ITAKURA, T.HIROSE, R.CREA, A.RIGGS, H.L.HEYNEKER,
F.BOLIVAR, H.W.BOYER, Science 198, 1056 (1977)
- 26 Review: S.N.COHEN,
Scient.Amer. 233, July 25 (1975)
- 27 R.CREA, A.KRASZEWSKI, T.HIROSE a.
K.ITAKURA, Proc.Natl.Acad.Sci.USA ,
75, 5765 (1978)
- 28 H.SELIGER, E.RÖSSNER, G.AUMANN, V.GENRICH,
M.HOLUPIREK, T.KNÄBLE u. M.PHILIPP,
Makromol.Chem. 176, 2915 (1975)
- 29 H.SELIGER, H.SCHÜTZ u. M.PHILIPP,
Makromol.Chem. 176, 2943 (1975)
- 30 H.SELIGER, G.AUMANN, V.GENRICH, H.H.GÖRTZ,
M.HOLUPIREK, T.KNÄBLE, E.RÖSSNER, H.SCHÜTZ
u. M.PHILIPP, Makromol.Chem. 176, 3127 (1975)
- 31 H.SCHÜTZ, Diplomarbeit, Freiburg i.Brsg. (1974)
- 32 L.Y.FROLOVA, V.G.METELYEV, K.I.RATMANOVA, V.D.
SMIRNOV, Z.A.SHABAROVA, M.A.PROKOFYEV, V.M.BERZIN,
I.V.JANSONE, E.J.GREN a. L.L.KISSELEV,
Nucleic Acids Res. 4, 2145 (1977)
- 33 P.C.ZAMECNIK a. M.L.STEPHENSON ,
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75, 280 (1978)
- 34 Review-Artikel: H.KÖSSEL u. H.SELIGER ,
in: L.Zechmeister, Fortschritte der
Chemie Organischer Naturstoffe ,
32, 297 (1975)
- 35 R.L.LETSINGER a. K.K.OGILVIE,
J.Amer.Chem.Soc. 91, 3350 (1969)
- 36 J.C.CATLIN a. F.CRAMER, J.Org.Chem. 38, 245 (1973)
- 37 K.ITAKURA, N.KATAGIRI, S.A.NARANG, C.P.BAHL
a. R.WU, J.Biol.Chem. 250, 4592 (1975)
- 38 J.STAWINSKI, T.HOZUMI, S.A.NARANG, C.P.BAHL
a. R.WU Nucleic Acids Res. 4, 353 (1977)
mit weiteren Zitaten
- 39 M.F.AUKATY, S.N.BUBENSCHIKOVA, V.K.KAGRAMMANOVA,
a. L.A.BARATOVA, J.Chromatgr. 137, 351 (1977)
- 40 H.J.FRITZ, R.BELAGAJE, E.L.BROWN, R.H.FRITZ,
R.A.JONES, R.G.LEES a. H.G.KHORANA,
Biochemistry 17, 1257 (1978)

- 41 K.L.AGARWAL, Y.BERLIN, H.J.FRITZ, M.GAIT,
D.G.KLEID, R.G.LEES, K.E.NORRIS, B.RAMAMOORTHY,
a.H.G.KHORANA ,
J.Amer.Chem.Soc. 98, 1065 (1976)
- 42 Review-Artikel über Diesterverfahren :
V.AMARNATH a. A.D.BROOM , Chem.Rev. 77, 183 (1977)
- 43 zum Beispiel: M.J.GAIT a. R.C.SHEPPARD ,
Nucleic Acids Res. 4, 4391 (1977)
- 44 R.B.MERRIFIELD , Science 150, 178 (1965)
- 45 H.SELIGER, M.HOLUPIREK a. H.H.GÖRTZ ,
Tetrahedron Letters 24, 2115 (1978)
- 46 V.GENRICH , Diplomarbeit Freiburg i.Br. 1973
- 47 H.G.KHORANA a. J.P.VISZOLY ,
J.Amer.Chem.Soc. 83, 675 (1961)
- 48 M.S.ĀOONIAN, A.J.SCHLABACK a. A.WEISSBACH ,
Biochemistry 10, 424 (1971)
- 49 H.SCHOTT, E.RUDLOFF, P.SCHMIDT, R.ROYCHOUDHURY
a. H.KÖSSEL , Biochemistry 12, 932 (1973)
- 50 R.M.DALE a. D.C.WARD ,
Biochemistry 14, 2458 (1975)
- 51 W.T.MELVIN a. H.M.KEIR ,
Biochem.J. 168, 595 (1975)
- 52 I.GILLAM, S.MILLWARD, D.BLEW, M.v.TIGERSTROM,
E.WIMMER a. G.M.TENER, Biochemistry 6, 3043 (1967)
- 53 M.HOLUPIREK , Dissertation , Universität Ulm (1978)
- 54 K.L.AGARWAL a. H.G.KHORANA ,
J.Amer.Chem.Soc. 94, 3578 (1972)
- P.J.CASHION, M.FRIDKIN, K.L.AGARWAL, E.JAY a.
H.G.KHORANA , Biochemistry 12, 1985 (1973)
- 55 H.GÖRTZ , Diplomarbeit , Universität Freiburg (1975)
- 56 H.G.KHORANA, J.P.VIZSOLI a. R.K.RALPH ,
J.Amer.Chem.Soc. 84, 414 (1962) : (pT)_n auch 47
R.K.RALPH, W.J.CONNORS, H.SCHALLER a.
H.G.KHORANA , ibid. 85, 1983 (1962) : (pdG)_n
R.K.RALPH a. H.G.KHORANA ,
ibid. 83, 2926 (1961) : (pdA)_n
H.G.KHORANA, A.F.TURNER a. J.P.VIZSOLYI ,
ibid. 83, 686 (1961) : (pdC)_n
- 57 E.SIEFERT u. E.HUSEMANN , Institut für Makromo-
lekulare Chemie der Universität Freiburg ,
unveröffentliche Ergebnisse
- 58 entnommen aus dem Buch:
C.R.LOWE, P.D.G.DEAN "Affinity Chromatography" ,
John Wiley Sons , London 1974

- 59 R.L.LETSINGER, J.L.FINNAN, S.A.JACOBS, B.A.JUODKA
a. A.K.VARSHNEY , Proceedings, Conference on
Synthesis, Structure and Chemistry of tRNAs and
their Components, Dymaczewo (Poznan) 1976, 369
- 60 T.SHIMIDZU a. R.L.LETSINGER ,
Bull.Chem.Soc.Jap. 44, 1673 (1971)
- 61 H.SCHOTT a. H.KÖSSEL ,
J.Amer.Chem.Soc. 95, 3778 (1973)
- 62 K.L.AGARWAL, A.YAMAZAKI a. H.G.KHORANA ,
J.Amer.Chem.Soc. 93, 2754 (1971)
- 63 H.KÖSTER a. R.FRANK , Chromatographia 9, 497 (1976)
- 64 H.WEBER a. H.G.KHORANA , J.Mol.Biol. 72, 219 (1972)
- 65 M.S.POONIAN, E.F.NOWOSWIAT a. A.L.NUSSBAUM ,
J.Amer.Chem.Soc. 94, 3392 (1972)
- 66 C.C.RICHARDSON ,
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 54, 158 (1965)
- 67 J.H.van de SANDE a. M.BILSKER ,
Biochemistry 12, 5056 (1973)
- 68 Y.TAGUCHI a. Y.MUSHIKA ,
Tetrahedron Letters 24, 1913 (1975)
- 69 M.RUBINSTEIN, B.ARNIT a. A.PATCHORNIK ,
Tetrahedron Letters 24, 1445 (1975)
- 70 G.M.TENER , J.Amer.Chem.Soc. 83, 159 (1961)
- 71 H.KÖSTER u. W.HEIDMANN , Angew.Chem. 85, 871 (1973)
- 72 H.KÖSTER, H.BLÖCKER, R.FRANK, S.GEUSSENHAINER,
W.HEIDMANN, W.KAISER a. D.SKROCH ,
Liebigs Ann.Chem. 1978, 854
- 73 K.E.PFITNER a. J.G.MOFFAT ,
Biochem.Biophys.Res.Comm. 17, 146 (1964)
- 74 G.WEIMANN a. H.G.KHORANA ,
J.Amer.Chem.Soc. 84, 419 (1962)
- 75 A.HOLY , Coll.Czech.Chem.Comm. 35, 3686 (1970)
- 76 A.KUMAR a. H.G.KHORANA , J.Mol.Biol. 72, 329 (1972)
- 77 D.G.KNORRE, A.V.LEBEDEV a. V.F.ZARYTOVA ,
Nucleic Acids Res. 3, 1401 (1976)
- 78 D.G.KNORRE a. V.F.ZARYTOVA ,
Nucleic Acids Res. 3, 2709 (1976)
- 79 J.SMRT , Tetrahedron Letters 33, 3437 (1972)
- 80 P.S.MILLER, J.C.BARETT a. P.O.P.TS'O ,
Biochemistry 13, 4887 (1974)
- 81 P.S.MILLER, K.N.FANG, N.S.KONDO a. P.O.P.TS'O ,
J.Amer.Chem.Soc. 93, 6657 (1971)
- 82 D.G.KNORRE , Vortrag bei British Chemical Society
Nucleotide Group, 10th Anniversary Meeting,
Birmingham , 1977

- 83 J.STAWINSKI, T.HOZUMI a. S.A.NARANG ,
Can.J.Chem. 54, 670 (1971)
- 84 H.GÖRTZ , Universität Ulm ,
unveröffentliche Ergebnisse
- 85 J.H.v.de SANDE, M.H.CARUTHERS, A.KUMAR a.
H.G.KHORANA , J.Biol.Chem. 571, 251 (1976)
- 86 V.L.DRUTSA, N.L.SOKOLOVA a. Z.A.SHABAROVA ,
Mol.Biol. 8, 734 (1974)
- 87 F.ECKSTEIN u. J.RIZK , Chem.Ber. 102, 2362 (1969)
- 88 C.B.REESE a. R.SAFFHILL , Chem.Comm. 1968, 767
- 89 C.B.REESE a. Y.T.YAN KUI ,
J.Chem.Soc.Chem.Comm. 1977, 802
- 90 J.H.v.Boom, P.M.J.BURGERS a. P.H.v.DEURSEN ,
Tetrahedron Letters 11, 869 (1976)
- 91 H.SCHALLER, G.WEIMANN, B.LERCH a. H.G.KHORANA ,
J.Amer.Chem.Soc. 85, 3821 (1963)
- 92 B.T.HUNT a. W.RIGBY , Chem. a. Industry 1868 (1967)
- 93 H.BÜCHI a. H.G.KHORANA , J.Mol.Biol. 72, 251 (1972)
- 94 F.CRAMER u. M.WINTER , Chem.Ber. 92, 2761 (1959)
- 95 J.H.v.Boom, P.M.J.BURGERS, G.v.der MAREL,
C.H.M.VERDEGAAL a. G.WILLE ,
Nucleic Acids Res. 4, 1047 (1977)
- 96 A.S.SOOD a. S.A.NARANG ,
Nucleic Acids Res. 4, 2757 (1977)
- 97 N.KATAGIRI, K.ITAKURA a. S.A.NARANG ,
Chem.Comm. 325 (1974)
- 98 T.HIROSE, R.CREA a. K.ITAKURA ,
Tetrahedron Letters 28, 2449 (1978)
- 99 N.KATAGIRI, K.ITAKURA a. S.A.NARANG ,
J.Amer.Chem.Soc. 97, 7332 (1975)
- 100 R.W.ADAMIAK, R.ARENTZEN a. C.B.REESE ,
Tetrahedron Letters 17, 1431 (1977)
- 101 J.H.v.Boom, P.M.J.BURGERS, P.H.J.v.DEURSEN,
R.ARENTZEN a. C.B.REESE ,
Tetrahedron Letters 43, 3785 (1974)
- 102 H.ROKOS, W.HUTZENLAUB, A.MYLES a. W.PFLEIDERER ,
Chem.Ber. 108, 2872 (1975)
- 103 K.K.OGILVIE, S.L.BEACAGE a. D.ENTWISTLE ,
Tetrahedron Letters 14, 1255 (1976)
- 104 K.L.AGARWAL a. F.RIFTINA ,
Nucleic Acids Res. 5, 2809 (1978)
- 105 R.A.HENRY, J.A.SCHMIT a. R.C.WILLIAMS ,
J.Chromatog.Sci. 11, 358 (1973)
- T.F.GABRIEL a. J.MICHALEWSKY ,
J.Chromatogr. 67, 309 (1972)

- 105 Fortsetzung: J.H.v.Boom a. J.F.M.de Roy ,
J.Chromatogr. 131, 169 (1977)
A.Floridi, C.A.Palmerini a. C.Fini ,
J.Chromatogr. 138, 203 (1977)
- 106 H.Seliger, E.H.Teufel a. M.Philipp ,
Biotechnol. Bioeng. , im Druck (1979)
- 107 E.Teufel , Dissertation, Univ. Ulm, (1979)
- 108 J.Hachmann a. H.G.Khorana ,
J.Amer.Chem.Soc. 91, 2749 (1969)
- 109 K.Itakura, N.Katagiri, S.A.Narang, C.P.Bahl,
K.J.Marians a. R.Wu , J.Biol.Chem. 250, 4592 (1975)
- 110 R.K.Ralph, W.J.Connors a. H.G.Khorana ,
J.Amer.Chem.Soc. 84, 2265 (1962)
- 111 E.M.Trip a. M.Smith ,
Nucleic Acids Res. 5, 1529 (1978)

IX. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Ac : Acetyl-

BSA : Benzenesulfonic acid

β -CEP : β -Cyanoäthylphosphat

p-ClPhT₂ : p-Chlorphenyl-phosphorsäureditriazolid

DC : Dünnschichtchromatogramm

DCC : Dicyclohexyl-carbodiimid

DEAE : Diethylamino-ethyl-cellulose

DMTr : Dimethoxytrityl-

DNS : Desoxyribonucleinsäure

EtOH : Äthanol

ibu : Isobutyryl-

MeOH : Methanol

MMTr : Monomethoxytrityl-

MS : Mesitylensulfonylchlorid

MST : Mesitylensulfonyltriazolid

MSTe : Mesitylensulfonyltetrazolid

N(Et)₃ : Triäthylamin

OD₂₆₀ : Optische Dichte: Das Produkt aus Extinktions-
einheiten (bei 1 cm Küvettendicke) und ml-
Lösungsvolumen einer UV-absorbierenden Probe
bei einer bestimmten Wellenlänge (hier 260 nm)

PEI : Polyethylenimin

t-RNS : transfer-Ribonucleinsäure

t-RNS^{Tyr.} : Tyrosin spezifische t-RNS

TBK : Triäthylammoniumbicarbonat

TPS : Triisopropylbenzolsulfonylchlorid

LEBENS LAUF

Geboren: 1.2.1949 in Baden-Baden

Eltern: Dr.med. Otto Schütz, Amtsarzt
Hedwig Schütz, geb. Neff

Schulen: Volksschule in Baden-Baden 1955-1959
Humanistisches Gymnasium Hohenbaden
in Baden-Baden 1959-1967
Abitur Juni 1967

Studium: Chemiestudium an der Technischen
Universität Karlsruhe
vom WS 1967/68 bis WS 1969/70
Vordiplom am 16.2.1970

Fortsetzung des Chemiestudiums an der
Universität Freiburg
Diplom am 2.5.1974 , Diplomarbeit
über "Sequenzspezifische Cooligokon-
densation von Derivaten des Desoxy-
thymidins und der Desoxyguanylsäure"

Doktorarbeit: von Juli 1974 bis März 1977 am
Institut für Makromolekulare Chemie
der Universität Freiburg,
ab April 1977 bis September 1978
in der Sektion Polymere an der
Universität Ulm
unter der Leitung von Prof.Dr. H.Seliger
über das Thema "Untersuchungen zur
chemischen Synthese eines sequenzspezi-
fischen Desoxyribooligonucleotides unter
Verwendung neuer Synthesemethoden "

Familienstand: verheiratet, ein Kind

